CONFERENCES - CONGRESS ...

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE ITALIANA

16 FEB 1931

ATTI

DEL

II° CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

MILANO, 22-23 MARZO 1930 - VIII

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE ITALIANA

ATTI

DEL

II° CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

MILANO, 22-23 MARZO 1930 - VIII

TUTTI I DIRITTI SONO RISERVATI

PUBBLICATO PER CURA
DELL'ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE

I.G.I.S. – Industrie Grafiche Italiane STUCCHI — Milano - Via S. Damiano, 16

II° CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

presso l'Istituto Sieroterapico Milanese

COMITATO DIRETTIVO

Presidenti Onorari:

Sen. Dott. Prof. Aldo Castellani – Sen. Dott. Prof. Alessandro Lustig

Presidente: Gr. Uff. Dott. Prof. Serafino Belfanti

Vice Presidente: S. E. Dott. Prof. Dante De Blasi - Accademico d'Italia

Consiglieri: Dott. Prof. Domenico Carbone – Dott. Prof. Gino De Rossi

Segretario Generale: Dott. Prof. Azzo Azzi

Segretari: Dott. Prof. Carlo Arnaudi – Dott. Prof. Giorgio Dessy

---

Un gruppo di Congressisti.

Digitized by the Internet Archive
in 2024

https://archive.org/details/attideliicongres0000vari

Il II° Congresso della nostra Sezione è stato convocato in Milano presso l'Istituto Sieroterapico Milanese per decisione unanime presa dai convenuti in Perugia nel maggio 1929 durante la nostra prima riunione tenuta in quella città. La riunione di Perugia ebbe esclusivamente lo scopo di definire le modalità della costituzione della nostra sezione; cosicchè se essa fu importantissima per l'avvenire della medesima, non ebbe tuttavia vero carattere scientifico di Congresso.

Il convegno di Milano, invece, ha avuto spiccato carattere scientifico e rappresenta effettivamente la nostra prima manifestazione anche se il Consiglio Direttivo lo ha elencato come Secondo Congresso Nazionale per iniziare la cronologia dei nostri Convegni con la prima riunione perugina.

A norma di statuto si dovevano discutere tre temi di relazione, assegnati dalla Presidenza, che insieme alle comunicazioni avrebbero dovuto essere distribuite ai Soci prima del Congresso. Purtroppo ciò non fu possibile per il ritardo con il quale quasi tutti i relatori inviarono i manoscritti, e ci si dovette accontentare di distribuire in bozza di stampa le tre relazioni durante i lavori. Questo inconveniente è nostro intendimento di evitare al prossimo congresso, a costo di rinunziare alle comunicazioni che pervenissero in ritardo.

***

L'inaugurazione del Congresso, onorata dalla presenza di S. E. il Prefetto di Milano Gr. Uff. Siragusa, e dell'Ill.mo Podestà di Milano, Duca Marcello Visconte di Modrone, si svolse alla presenza di un folto numero di Professori dell'Università di Milano e di Pavia e di numerosissimi soci, fra i quali ricordiamo:

Andrei G., Torino – Arnaudi C., Milano – Azzi A., Torino – Bertarelli E., Pavia – Barelli, Milano – Bianchini, Milano – Boncinelli, Firenze – Belfanti C. Milano – Belfanti S., Milano – Bondioli M., Lodi – Borghi B., Milano – Brusa P., Milano – Bezzola F., Milano – Bruni A. C., Milano – Bastai P., Modena – Cantani A., Napoli – Cazzani U., Milano – Cantani F., Napoli – Calamida U., Milano – Cerruti F. C., Torino – Canelli A., Torino – Croveri P., Torino – Chiodi A., Milano – Carminati V., Milano – Carbone D., Milano – Cucco G. P., Torino – Casagrandi O., Padova – Corpaci A., Milano – Cuboni E., Milano – Chini R., Milano – Canuto G., Torino – Curzi M., Roma – Calandra A., Forlì – Dessy G., Milano – Davanzo I., Torino – De-Filippis V., Parma – Di Guglielmi G., Pavia – De-Rossi G., Perugia – Fortuna E., Milano – Fornario P., Milano – Favilli P., Firenze – Francioli E. M., Milano – Fugazza E. G., Milano – Finzi O., Milano – Foà A., Milano – Foà C., Milano – Guardabassi G., Perugia – Gardella E., Verona – Guerrini G., Modena – Gori P., Firenze – Jarach M., Milano – Lattes L., Modena – Lustig A., Firenze – Lusena M., Padova – Leoni M., Milano – Leinati G., Milano – Lazzati G., Milano – Lucchini O., Milano – Nai D., Milano – Mazza E., Milano – Mazzucchi M., Milano – Monti A., Pavia – Micheli F., Torino – Mino M., Torino – Mezzadroli G., Bologna – Morelli E., Firenze – Messieri A., Bologna – Mosnar M., Milano – Nosotti N., Milano – Ottolenghi D., Bologna – Provera P., Milano – Polverini G., Milano – Pugliese A., Milano – Pratolongo U., Milano – Pepere A., Milano – Piccininni F., Milano – Patanè C., Milano – Piccinini P., Milano – Paoli P., Milano – Pampana I., Milano – Pasinetti L., Milano – Pepeu F., Milano – Ragazzi M., Milano – Rondoni P., Milano – Ronzani E., Milano – Rigobello G., Pavia – Reitani U., Milano – Ramazzotti G., Milano – Revelli M., Torino – Sollazzo I. C., Milano – Scalfi A., Milano – Stazzi P., Milano – Sette N., Ancona – Segre S., Torino – Segre V., Milano – Torri G. C., Milano – Trambusti A., Genova – Tron G., Milano – Valagussa F., Roma – Vernoni G., Roma – Vercellana G., Parma – Vidolich D., Milano – Viganò L., Milano – Voglino P., Torino – Valenti E., Milano – Trivellini A., Torino – Zanzucchi A., Parma – Zironi A., Milano.

Lettere e telegrammi di calorose adesioni di cui diede lettura il segretario Prof. Arnaudi, avevano inviato il Vice Presidente della nostra Sezione S. E. Prof. De Blasi, i Senatori Menozzi, Simonetta, Quartieri, Castellani; i Professori Padre A. Gemelli, Rettore dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Montemartini, Traverso.

Accolto da vivi applausi, il nostro Presidente Prof. SERAFINO BELFANTI porse il saluto ed il ringraziamento del Consiglio Direttivo alle Autorità convenute ed ai consoci presenti; inaugurando quindi i lavori del Congresso con il seguente discorso:

Eccellenze, Signore, Signori,

Se pure non è tra i miei desideri di tenervi un discorso, tanto più dato il grande numero di questioni e di studi presentati per essere discussi nel nostro Congresso, è necessario tuttavia ch'io, quale Presidente della Società di Microbiologia, vi dia un breve resoconto morale di quanto è stato fatto nello scorcio dei primi dieci mesi di vita della nostra Sezione. Della parte finanziaria parlerà poi nell'ultima Seduta il Segretario della Nostra Società, Prof. Azzi.

Le esitazioni che mi avevano turbato nel prendere l'iniziativa per la costituzione della Sezione Italiana della Società Internazionale di Microbiologia, sono ormai superate: il cammino percorso nel breve periodo trascorso dalla fondazione mi conforta ora con la convinzione che non abbiamo fatto cosa superflua e tanto meno inutile.

Gli aderenti, infatti, che alla fine dello scorso anno erano in numero di 180, *ora raggiungono i* 270 (*numero cospicuo quando si rifletta che soltanto pochi Istituti in Italia si occupano di Microbiologia*) *e vanno ancora aumentando, come dimostrano le adesioni che continuano a pervenirci.*

Le direttive segnate nel discorso tenuto a Perugia, alla prima riunione della Società, furono perseguite con quella alacrità che sola può dare qualche frutto. Lo scopo di affiatare il più possibile tra loro i cultori italiani di Microbiologia sparsi in disparate branche della Scienza, fu una delle ragioni fondamentali della nostra costituzione in Società. La dispersione di forze non collegate, faceva sì che i lavori italiani, diluiti in un'innumerevole congerie di giornali scientifici ed ivi quasi sepolti, trovavano troppa difficoltà ad entrare, salvo eccezioni, nell'arringo scientifico mondiale: l'Italia in questo campo era troppo assente perchè lo studioso non ne risentisse danno.

Come affermavo allora, la nostra Società si è prefissa di raccogliere, appunto, queste note sparse sulla biologia dei microorganismi, togliendole sia dalla medicina, sia dalla botanica, dall'igiene, dall'agraria o da quelle Scienze tecniche che s'appoggiano alla loro conoscenza; a ciò che gli stranieri possano rapidamente conoscere quanto su tali questioni concludono le ricerche eseguite nei singoli laboratori.

Così è nato il nostro Bollettino *che, se pure non è perfetto, ha raccolto nel breve periodo della sua esistenza ben* 153 *note di* 97 *autori diversi. Di ogni suo numero* 500 *copie sono inviate a studiosi ed a giornali stranieri che si occupano di Microbiologia. Il risultato tangibile di questa sistematica diffusione, lo avrete constatato Voi pure sfogliando le riviste straniere che riassumono largamente i lavori comparsi nel nostro Bollettino; ricorderò tra queste il « Bulletin de l'Office*

International d'Hygiène publique », la « Revue d'Hygiène et de Médecine préventive », il Zentralblatt fur die gesamte Hygiene ».

Il concetto della rapidità è essenziale anche nel campo scientifico. Il fervore, col quale si compie il lavoro sperimentale oggidì, deve essere sorretto da rapidità di pubblicazione, se non si vuole assistere a incresciose perdite di priorità, dovute alla migliore organizzazione bibliografica degli stranieri. Da noi è stata più volte lamentata la pletora di giornali, archivi, riviste, atti ecc., editi in troppo grande numero e con estrema lentezza, creando spesso un comodo alibì ad autori stranieri che ignorano il lavoro italiano essendo nell'impossibilità di leggere tanti giornali introvabili o quasi. Ciò è tanto risaputo che allorquando gli studiosi italiani vogliono accertarsi la diffusione dei propri lavori, procurano di pubblicare su riviste di lingua straniera.

Il nostro « Bollettino » raccoglie sotto forma di note preventive *tutti i lavori di microbiologia italiana ed assolve pertanto il compito di diffusione della nostra opera scientifica,* lasciando impregiudicata la delicata questione della molteplicità dei giornali.

Ecco quindi un primo frutto dei nostri sforzi che siamo lieti di segnalare a Voi egregi Colleghi. La fatica non è stata indifferente per i miei collaboratori Professori Arnaudi e Dessy, ai quali incombe il lavoro di accettazione e redazione delle memorie da pubblicarsi, ed io non posso esimermi qui di dar loro il dovuto ringraziamento.

Certo, se noi confrontiamo il settimanale « Comptes rendus de la Société de Biologie » col nostro Bollettino mensile, constatiamo che esso è ancor troppo lento. Dovete però riconoscere con me, che un vigoroso passo in avanti è stato fatto; del resto è in facoltà Vostra più che mia far sì ch'esso possa ancora e presto migliorare, facendo affluire un maggiore numero di lavori con cui alimentare il giornale. Possiamo calcolare che in Italia si pubblicano 600 *lavori all'anno nei diversi campi della Microbiologia: se tutti gli autori inviassero riassunti preventivi delle loro ricerche, il Bollettino potrebbe facilmente uscire quindicinalmente, con quale vantaggio per i nostri studi può giudicare ognuno di Voi. Oggi al contrario la redazione deve spesso attendere un lavoro, o sollecitarne un altro, per poter seguire le necessità tecniche ed organizzative del giornale, che si devono pur tener presenti. Un rilievo che sono costretto di fare nei riguardi delle pubblicazioni, è la scarsa collaborazione dei microbiologi botanici. Ciò è tanto più spiacevole in quanto questo ramo della Microbiologia ha in Italia nobili tradizioni e valorosi cultori. L'importanza che lo studio dei miceti patogeni va ogni giorno assumendo, fa desiderare una più intima unione di questi studiosi con i Microbiologi medici e veterinari, per quelle considerazioni scientifiche d'ordine generale che rappresentano uno degli scopi della nostra Società e sulle quali mi sono intrattenuto più a lungo al passato Congresso di Perugia.*

Allo scopo di promuovere l'intesa scientifica tra i cultori italiani della Microbiologia nei vari rami delle scienze applicate, doveva nell'intendimento dei soci fondatori aggiungersi quello di far presente ai promotori del Congresso Internazionale, che si terrà in Parigi nel luglio prossimo, come anche in Italia questa

scienza abbia largo culto e come i nostri studiosi vi avrebbero partecipato volentieri riuniti in un gruppo Nazionale.

Voi avete appreso dal Bollettino come i nostri desiderata *sieno stati largamente accettati dalla Segreteria e dalla Presidenza del Congresso e come ben sei Italiani sieno relatori nelle varie Sezioni del medesimo e cioè il Sen. Prof. Sanarelli ed il Prof. Vernoni in quella di Batteriologia medica; il Prof. Belfanti ed il Prof. Lattes in quella di Sierologia ed Immunità; il Prof. Carbone in quella di Botanica e Parassitologia ed il Prof. Volpino nelle dimostrazioni di Laboratorio. Di questa attiva partecipazione nostra abbiamo motivo di rallegrarci, poichè darà modo ai relatori italiani di dimostrare la serietà e profondità degli studi nostri intorno agli argomenti che dovranno svolgere.*

Ed è specialmente da questo punto di vista che la nostra prima riunione scientifica (perchè quella di Perugia si fece solo per firmare, dirò, la carta di fondazione) è stata indetta poco prima del Congresso internazionale di Parigi, quasi per affiatarci, e per far sì che coloro che vi si recheranno come relatori o per comunicare studi e ricerche, sappiano a priori quanto è stato fatto in questi argomenti dai colleghi italiani, e se e dove le idee convergano o divergano tra loro, in modo che anche tra pareri diversi non manchi quella serenità ed obbiettività di giudizio che rammenti all'ascoltatore che la verità non è mai assoluta, ma, come ben dice un illustre filosofo nostro:

Ogni vero pensatore nel pronunziare una verità, vuole che sia inteso che quella verità è anche non verità, nel senso che tale diventa non appena si esca fuori dalle condizioni per cui fu pensata.

Nell'esperimento biologico le condizioni di due ricercatori intorno ad uno stesso problema saranno spesso parallele, ma difficilmente sovrapponibili: potranno quindi sboccare a risultati anche diversi e ciò naturalmente può portare a diffidenze ed a pregiudizi per la nostra scienza, se superficialmente giudicate. La scienza biologica non si può coercire entro regole fisse, perchè — come la vita da cui si origina — è anch'essa in continuo divenire.

Le relazioni che io, per l'autorità datami dal Regolamento della nostra Società, ho creduto di affidare ai valenti studiosi che Voi conoscete, sono state improntate a tre dei temi che saranno svolti a Parigi nella Sezione di Microbiologia e cioè:

Le variabilità microbiche
La scarlattina
La febbre ondulante e l'aborto epizootico.

L'importanza scientifica assunta in questi ultimi anni da tali problemi che involgono necessità pratiche ed igieniche di altissimo momento, è chiaramente indicata dal numero dei relatori e dalle varie nazionalità cui essi appartengono, e cioè: 5 relatori per il primo argomento, 7 per il secondo e 5 per il terzo. È d'alta importanza quindi che i relatori nostri e gli studiosi italiani che vorranno prendere parte alle discussioni siano preparati anche e sopratutto su quanto in argomento si è fatto da noi.

Ecco in brevi parole una delle finalità alla quale, d'accordo coi Colleghi, ha voluto improntare questa nostra riunione.

Ma non bisogna mai dimenticare, che se gli scopi internazionali servono ai vincoli per una ben intesa fratellanza scientifica, utile oltre che al progresso umano anche al decoro della nostra cara Patria, un altro scopo fondamentale di questo Congresso è quello di tener viva la fiamma della ricerca e di dare, specialmente ai giovani, la palestra ove possano mostrare nei risultati dei loro studi l'acume sperimentale che infervorava i grandi nostri Biologi del passato, nel provare e riprovare, e non nel provare poco e scrivere troppo.

È con questa visione, che io credo condivisa da Voi tutti qui convenuti, ch'io apro il nostro II° Congresso; non prima però d'aver inviato il deferente augurio e l'ossequio — non solo come di rito, ma con profondità di sentimento come di un culto — ai due che reggono e dirigono i destini della nostra cara Patria, a Sua Maestà il Re ed al suo grande Ministro Benito Mussolini! (vivissimi applausi).

VERBALI DELLE SEDUTE

Seduta antimeridiana del 22 Marzo 1930.

Prof. BELFANTI (Presidente). – Prego il prof. Curzi di svolgere la relazione del prof. Petri:

Le variazioni a salti (*saltations*) dei microrganismi ed il loro significato biologico.

Nella ricerca dei mezzi efficaci di lotta contro i microrganismi patogeni una delle condizioni necessarie per il successo, è quella che ci è fornita dalla nozione, il più che sia possibile esatta, della variabilità del microrganismo che si deve combattere. È infatti una delle più elementari precauzioni dello stratega quella di cercar di conoscere con precisione sotto quali forme e con quali mezzi di attacco può presentarsi il nemico. La *plasticità* di alcuni microrganismi patogeni nel campo della patologia vegetale, cioè l'adattabilità loro ad ospiti diversi, è spesso apparente, giacchè lo studio genetico di questi microrganismi ha dimostrato come una data specie o anche una data varietà possa esser costituita da un numero più o meno grande di razze o forme distinte fra loro e dalla forma tipica soltanto da proprietà fisiologiche diverse, non da differenze morfologiche facilmente apprezzabili, per cui apparentemente sembra che in vari casi osservati di una determinata malattia sopra ospiti diversi, per quanto sistematicamente affini, si tratti sempre dello stesso agente patogeno, mentre in realtà si tratta di diverse forme di quest'ultimo, fisiologicamente specializzate nel loro potere parassitario.

Di un simile fenomeno noi troviamo esempi molto istruttivi nei funghi che producono la cosidetta « ruggine » dei cereali.

Sembrava qualche anno fa di aver raggiunto un risultato molto notevole con questa nozione e si era creduto di poter dare ai genetisti, che nel campo botanico lavoravano e lavorano per selezionare

o per produrre con l'ibridazione piante resistenti a determinati microrganismi patogeni, una certa assicurazione sulla fissità delle varie forme fisiologiche esistenti di un dato parassita, in modo che variando la pianta ospite non sarebbe stato da temere che per eventuali variazioni del parassita si rendesse possibile l'originarsi di altre forme con nuove proprietà fisiologiche, capaci di attaccare il nuovo prodotto della selezione o dell'ibridazione.

Ma in questi ultimi anni alcuni fenomeni sono stati posti in luce che permettono di considerare le possibilità e le modalità di variazione dei microrganismi da un punto di vista assai differente da quello che poteva sembrare il più razionale una ventina di anni fa.

Questi fenomeni sono l'*eterotallismo sessuale* dei funghi, le variazioni brusche, che si verificano nelle colture di funghi o di batteri, e che molti microbiologi inglesi ed americani chiamano *saltations (variazioni a salti)* e che altri definiscono per *mutazioni* o *dissociazioni,* ed infine le varie fasi *ciclogeniche* di molti batteri e le variazioni indotte dal batteriofago di D'Hérelle.

Dell'omotallismo ed eterotallismo dei funghi ho già trattato assai diffusamente in una rivista riassuntiva nel 1928 e quindi a questo riguardo nella presente relazione mi limiterò a ricordare quelle nozioni che possono chiarire la natura di certe variazioni. Quanto la scoperta dell'eterotallismo faceva prevedere sin da principio sulla possibilità di una variazione dei funghi per effetto dell'ibridazione, è oggi un fatto ben dimostrato. Come riferirò in seguito, alcune variazioni possono infatti essere interpretate come il risultato della disgiunzione, che si verifica vegetativamente, di forme eterozigote. Ma a questo fenomeno non si può certo attribuire oggi tutta l'importanza che Brierley ha creduto di assegnargli come causa di quella singolare forma di variazione settoriale, improvvisa e spontanea, presentata dalle colonie di funghi e di batteri e che ha richiamato l'attenzione dei micologi in modo particolare sino dal 1908.

I. Esposizione dei risultati di alcune ricerche. — Fu l'Edgerton che in quell'anno, pubblicando i risultati di alcune sue esperienze intorno all'influenza dell'ambiente sopra le variazioni dei caratteri colturali di alcune forme di *Gloeosporium,* riferì di aver trovato che nelle colture di questo fungo si presentavano delle variazioni brusche per le quali si originavano nuovi stipiti differenti dalla forma originaria e da altre forme conosciute. Questi nuovi stipiti conservarono immodificati i loro caratteri per tutto il tempo in cui furono riprodotti in coltura.

Edgerton considerò come vere mutazioni questo tipo di variazioni brusche e durevoli, di una natura dunque diversa da quelle variazioni indotte dalle proprietà del substrato nutritivo o da altre condizioni dell'ambiente e che durano sino a tanto che sussistono queste condizioni eccezionali. Lo stipite variante si presentava in generale nella colonia da cui aveva avuto origine come un settore che presentava caratteri morfologici più o meno differenti da quelli della forma materna.

Dopo il lavoro di Edgerton numerosissime sono state le constatazioni di variazioni brusche nei funghi. Citerò le principali. Elisabetta Schiemann ha compiuto molte ed accurate osservazioni sull'*Aspergillus niger*, cercando di determinare la frequenza delle variazioni brusche in questo fungo coltivato nelle condizioni normali e l'influenza che sul numero delle variazioni hanno diverse condizioni anormali di coltura. La Schiemann trovò che su 178 colonie ottenute in condizioni normali si presentò un solo variante e cioè meno del 0.5 %, in 397 colture, che furono sottoposte a diverse stimolazioni di natura chimica, comparvero 8 varianti e cioè circa il 2 %.

Anche la Haenicke ricorse all'azione di sostanze tossiche per provocare variazioni nel *Penicillium*. Lo stesso risultato ottenne pure con la temperatura elevata, con la concentrazione degli elementi nutritivi e con la reazione del substrato. Con questi mezzi però le variazioni morfologiche costituivano ciò che i genetisti botanici chiamano delle *modificazioni*, giacchè sparivano dopo una o poche generazioni in assenza dell'azione stimolante. Crabill trovò che una determinata forma di *Coniothyrium pirinum*, di tempo in tempo, presentava spontaneamente la separazione di un nuovo stipite, che isolato e coltivato anche su mezzi diversi, restava costante nei suoi caratteri e sempre diverso dalla forma originaria. Le differenze non erano trascurabili, perchè mentre la forma materna possedeva picnidi numerosi e uniloculari, lo stipite variante formava pochi picnidi e multiloculari. Variazioni spontanee vennero constatate nel genere *Glomerella* da Shear e Wood, nel gen. *Aspergillus* da Thom e Church, nel gen. *Rhizoctonia* da Matsumoto, nel gen. *Cladosporium* da Brooks e Hansford.

Brierley osservò la improvvisa comparsa, in una coltura di *Botrytis cinerea*, che possiede, come è noto, sclerozi neri, di uno stipite a sclerozi bianchi. Questa variazione è rimasta costante nelle successive generazioni.

Burger ha constatato nelle colture di *Colletotrichum gloeospo-*

rioides la comparsa di settori con caratteri diversi da quelli della forma originaria. Egli ha potuto riconoscere in questi stipiti varianti una grande somiglianza, per non dire identità, con varietà o piccole specie del *Colletotrichum glocosporioides* trovate in natura. Sopra i substrati nutritivi artificiali è dunque possibile la segregazione di forme già avvenuta in natura.

Stevens ha dato una accurata descrizione di simili variazioni nell'*Helminthosporium sativum*, che nell'Illinois è un agente frequentissimo del mal del piede del grano.

I caratteri colturali di questo fungo sono stati studiati molto accuratamente sopra numerosi substrati nutritivi, il migliore dei quali è risultata la farina di granoturco agarizzata o il decotto di germogli di *Mays* pure agarizzato. I caratteri morfologici del micelio e delle spore variano assai secondo le condizioni del mezzo. La formazione di sclerozi è favorita dalla scarsità di acqua. Ma la comparsa nelle colonie di settori differenziati per rapidità di accrescimento, per grado di produzione dei conidi, per caratteri morfologici di questi, per il colore e la zonatura del micelio ed infine per la formazione di sclerozi, è stata constatata in condizioni colturali identiche trattandosi di un fenomeno che si presentava in una stessa colonia. Certuni di questi varianti eccedevano nei loro caratteri nuovi i limiti comunemente ammessi fra specie e specie nel genere *Helminthosporium*. Interessante è la correlazione fra certi caratteri che è stata osservata da Stevens nelle variazioni. Colonie ad accrescimento lento erano in generale molto produttive di conidi e viceversa. In altri casi l'accrescimento rapido e scarsa produzione di conidi, tendenza cioè alla sterilità, erano accompagnati da una colorazione debole. Molto micelio aereo era accoppiato a una bassa produzione di conidi. Il ritorno al tipo originario è stato osservato da Stevens in alcuni stipiti, però egli non ha mai constatato che il carattere variante, mostratosi costante dopo numerosi trapianti, sia ritornato al tipo della forma primitiva. Tutti i tentativi fatti per provocare artificialmente con vari mezzi delle variazioni durature sono falliti.

Stevens ha studiato 126 settori varianti formatisi in colture derivate da una sola spora, per cui è da escludere qualsiasi inquinamento come causa di queste variazioni. Stevens non ha creduto di considerarle come vere mutazioni e le ha chiamate *saltations* (variazioni a salti, variazioni brusche) ritenendole analoghe alle variazioni o mutazioni gemmari delle piante superiori *(bud-sporting)*.

Blochwitz selezionando degli stipiti di *Aspergillus versicolor* ha

ottenuto una forma a conidi blu e che si è rivelata stabile, almeno per 40 generazioni, malgrado le svariate condizioni di coltura in cui è stata posta. Il colore dei conidi nella maggior parte degli *Aspergillus* è dovuto alla combinazione del pigmento contenuto nell'interno della cellula con quello della membrana della spora. Nell'*A. versicolor* la colorazione interna è blu e gialla quella della membrana, nella razza variante manca il pigmento della membrana. L'originarsi di questo stipite a conidi blu non si è rivelato con la formazione di un settore in una singola colonia, ma come ho detto e come è avvenuto in altre ricerche simili, la separazione della forma variante è avvenuta per selezione artificiale.

Chandhuri ha studiato la variabilità di un *Colletotrichum (C. biologicum* Chand.) isolato da tuberi di patata. Dopo quattro mesi di coltura e cioè dopo 16 generazioni, il fungo dette origine improvvisamente sopra farina di avena agarizzata a uno stipite nuovo dotato di un micelio del colore normale e con cerchi concentrici di grossi sclerozi come la forma originaria, ma formante anche sclerozi piccoli in linee radiali. Questo carattere nuovo era conservato nelle colture su farina di avena agarizzata, ma scompariva se il fungo era riportato su patate. Evidentemente Chandhuri ebbe a che fare con una variazione che può esser resa manifesta soltanto da particolari condizioni di nutrizione.

Una variazione a settore nelle colture provenienti da un solo conidio fu constatata da Roberts nell'*Alternaria Mali.* Il settore variante mancava di micelio aereo ed aveva conidi di colore olivaceo, mentre il rimanente della colonia aveva conidi di color ambra. Le due forme sono rimaste costanti nei loro caratteri differenziali. Il fatto che i conidi di *Alternaria* sono pluricellulari e che ciascuna cellula può dare origine a un micelio, può rendere nelle colture monosporogenite di questo fungo più frequente la variabilità in confronto ai funghi con conidi unicellulari.

Leonian ha studiato 53 razze o stipiti diversi di molte specie di *Phytophthora* dal punto di vista della variabilità dei principali caratteri morfologici e fisiologici che questi funghi presentano in coltura. Variazioni brusche con la comparsa di settori differenziati nelle colonie sono state constatate e l'isolamento e la coltura delle diverse forme varianti seguite per parecchie generazioni, hanno dimostrato che i caratteri nuovi sono per lo più incostanti e reversibili e che nessuna specie nuova o varietà è stata ottenuta per questo tipo di variazione.

Brown, che si è dedicato per alcuni anni allo studio del genere *Fusarium*, uno dei più difficili dal punto di vista della sistematica, per la molteplicità di forme e per la variabilità dei caratteri morfologici, ha compiuto numerose ed accurate ricerche sulle variazioni repentine che spesso si osservano nelle colture di questi funghi.

Le osservazioni del Brown hanno una particolare importanza e devono esser riferite assai dettagliatamente. Come gli osservatori precedenti, egli ha eseguito le sue ricerche sempre su colonie provenienti da una sola spora, o, nel caso di miceli sterili, da un'estremità di un'ifa. Il substrato nutritivo che si è dimostrato più favorevole all'apparire di variazioni brusche e durevoli è la soluzione di Richards agarizzata. (1) Relativamente al numero delle colture fatte, il numero di quelle nelle quali le variazioni sono comparse è stato quasi insignificante. Alcune razze, in confronto ad altre, hanno mostrato una spiccata tendenza a produrre forme nuove. Queste non sempre appariscono come un settore della colonia, ma come aree isolate. La percentuale di queste aree dove si originano gli stipiti varianti aumenta con l'età della colonia e in una stessa colonia queste aree sono più numerose nella regione centrale che al margine.

Può avvenire che la forma nuova possegga un grado di virulenza minimo in confronto alla forma originaria e se questa è sopraffatta dalla prima, la coltura finisce per fornire spore o micelio dotati di proprietà puramente saprofitiche. Il fatto è facile a verificarsi quando lo stipite variante produce moltissime spore, mentre la forma originaria, patogena, è sterile o produce un piccolo numero di spore. Probabilmente molti casi di perdita di virulenza di funghi parassiti, dopo alcun tempo che si trovano in coltura, sono attribuibili allo sviluppo preponderante di una forma non patogena originatasi per variazione e sfuggita all'osservazione del fitopatologo.

Così può accadere il fatto opposto. Confrontando fra di loro la forma originaria e quella derivata per variazione si può infatti trovare in qualche caso un'intensificazione di un determinato carattere morfologico o fisiologico. Così una data razza *A* che presenta una co-

---

(1) La composizione della soluzione di Richards è la seguente:

Saccarosio	gr.	50,00
KNO_3	»	3,00
KH_2PO_4	»	5,00
$MgSO_4$	»	2,50
FeCl		tracce
H_2O	»	1000,00

lorazione moderata, mentre dà origine a un variante A_1 che è privo di colore, dà origine a un altro variante A_2 che presenta una colorazione intensa. La stessa razza A sopra un dato substrato forma poco micelio aereo, un suo variante A_6 non ne forma affatto, A_7 al contrario ne forma uno molto sviluppato. Similmente un'altra razza D, che sporifica moderatamente, produce stipiti varianti che sporificano intensamente ed altri che restano quasi sterili.

Brown non ha mai osservato che la razza A dia origine alla razza D e questa ritorni poi alla razza A, e neppure che i singoli stipiti sorti per variazione ritornino alla forma originaria. La variazione delle diverse razze di una data specie possono presentarsi anche progressivamente nel senso che può originarsi da una forma originaria uno stipite assai dissimile da questa per successive variazioni brusche. Generalmente il carattere morfologico che differenzia la razza originaria da quella comparsa per variazione acquista un grado d'intensità maggiore al limite fra le due razze. Così, per es., se il settore variante presenta una colorazione, questa ha la massima intensità lungo le due linee di contatto del settore con il rimanente della colonia.

Esaminerò più oltre le deduzioni teoriche sulla natura di queste variazioni con cui Brown chiude il suo lavoro.

Chodat dalle colture di *Aspergillus ochraceus* ha ottenuto per variazione brusca una razza γ che dopo molte generazioni ha dato nuovamente per variazione improvvisa la forma originaria. Nelle colture di *Phoma Alternariaccarum* la forma normale α si è conservata costante per 13 mesi su mezzi diversi, poi ha prodotto in un settore una razza γ che si è mostrata costante riprodotta per più di un anno. Selezionando le spore di α, Chodat ha isolato una forma intermedia fra α e γ, la razza G. Questa per variazione brusca ha dato origine a una forma intermedia fra α e γ, la razza G. Questa per variazione brusca ha dato origine improvvisamente ad un'altra razza W più rigorosa e più vicina a G.

Quest'ultima ha dato origine a due nuovi stipiti B, analogo a V, e N, analogo a W. Questi stipiti, non essendo stati mai selezionati per mezzo delle colture monosporogenite, non possono esser ritenuti da Chodat come vere razze.

Le razze V e W invece si sono conservate costanti nei loro caratteri per tutto il tempo in cui sono state coltivate.

Senza poter dare un giudizio sicuro, Chodat ritiene che le variazioni osservate sieno in relazione con le proprietà del substrato col-

turale. Per l'*Aspergillus*, per es., la forma variante più vigorosa è comparsa su mezzo assai povero.

Chodat considera le proprietà nutritive del substrato colturale come un fattore rivelatore della variazione, cioè esso renderebbe visibile una modificazione già preesistente. Ma di questo concetto sarà detto più oltre.

Horne e Mitter hanno constatato variazioni a salti frequentemente nel genere *Fusarium* e precisamente nelle specie della sezione *discolor*. In alcuni casi le differenze morfologiche e fisiologiche fra forma originaria e forma variante erano più grandi di quelle fra singole specie di questa sezione. Le forme varianti differivano dalle forme originarie, per ciò che riguarda il potere patogeno, per una minore virulenza.

Nakata ha descritto due forme originatesi due anni prima delle sue ricerche per variazione brusca dallo *Sclerotium Rolfsii* Sacc. Le due nuove forme sono indicate con M_1 e M_2. Le ife di M_1 erano brune e sottili, formanti una superficie cotonosa. Questa forma mostrava un'avversione per la forma originaria, ed un'avversione reciproca mostravano fra loro M_1 e M_2. Questi due nuovi stipiti hanno sempre conservato i loro caratteri anche se coltivati sui più differenti substrati.

Nello *Sclerotium Rolfsii* la fusione fra ife avviene sempre fra miceli appartenenti alla stessa forma, mentre fra miceli di forme diverse si manifesta un'avversione reciproca. Per questa ragione Nakata ritiene che le due forme M_1 e M_2 debbano esser riguardate non come derivanti da una segregazione in uno eterozigoto, ma da una mutazione, paragonabile alla mutazione gemmare delle piante superiori.

Hemmi e Matsuura hanno constatato la comparsa, per improvvisa variazione, di una forma albina in una coltura di *Brachysporium* isolato da una piantina germinante di riso sino dal 1925. La colonia madre aveva un colore bruno scuro per cui il settore del variante, bianco, risaltava molto nettamente. Il micelio albino non era sterile, ma i conidi, circolari, avevano la forma e le dimensioni eguali a quelle della forma originaria. Le colture eseguite partendo da una sola di tali spore rimasero sempre albine.

Tanto la forma originaria che quella albina mostravano approssimativamente lo stesso grado di virulenza se inoculate in piantine germinanti di riso.

Mohendra ha studiato la variabilità della *Ncocosmospora vasinfecta,* di due specie di *Phoma* e dell'*Alternaria tenuis* sopra diversi substrati nutritivi, trapiantando del micelio giovane, del micelio vecchio o delle sole spore. Variazioni brusche sono state osservate in tutti e quattro i funghi. Nella forma variante di *Neocosmospora* scompariva la proprietà di formare periteci, nei varianti delle due specie di *Phoma* il carattere che subiva modificazioni era il collo dei picnidi. L'*Alternaria tenuis* si è mostrata molto soggetta a subire brusche variazioni che sono rimaste costanti, meno una che ha presentato la reversione al tipo materno. Uno stipite ha mostrato regolarmente variazioni a salti. Anche Horne e Das Gupta constatarono nella *Diaporthe perniciosa* l'esistenza di una forma che essi hanno chiamato « ever-salting » per le continue variazioni a salti presentate. Gli autori hanno studiato con molta cura il rapporto della comparsa della variazione col tempo, con le condizioni nutrive e con la temperatura.

Numerose colture furono preparate da un solo frammento di ifa per ciascuna. Queste colture, che rimasero tutte eguali fra loro, furono considerate come rappresentanti della forma originaria indicata con *B*. Colture monoifali da *B* hanno dato per variazione improvvisa la forma *C;* un discendente di questa C_1 è stato scelto per le ricerche che i due autori si erano proposti di eseguire. Dopo due settimane di coltura sono stati prelevati frammenti di micelio da due punti nella regione vecchia della colonia e due nella regione marginale, più giovane.

I due primi trapianti hanno dato colonie che erano simili alla forma originaria *B* e gli altri due hanno dato colonie che erano simili a *C*. Quest'ultima forma C_2 poi ha generato un settore per variazione con tutti i caratteri di *B*. Questo stipite è stato indicato con *F*. Prelevando da una colonia di C_2 del micelio vecchio e di quello giovane si ottengono, rispettivamente, la forma F_1 e la forma C_3. Le successive generazioni di *C* si comportano nello stesso modo come mostra lo schema qui unito. La forma *F* si è dimostrata costante nelle successive generazioni, solo una volta ha riprodotto per variazione brusca la forma *C* che è stata isolata.

La relazione fra l'età del micelio e il tipo di colonia prodotto induce a ritenere che la variazione avviene in un tempo definito. Horne e Das Gupta hanno eseguito colture con micelio prelevato da una colonia adulta in modo che ogni trapianto corrispondesse a un giorno di vita del micelio. Questa esperienza ha dimostrato

che l'incidenza della variazione avviene al 6° giorno di accrescimento del micelio e cioè prelevando del micelio da un medesimo punto della colonia prima del 6° giorno di età si riproduce la stessa forma *C*, dopo il 6° giorno i prelevamenti di micelio danno origine a colonie della forma *F* (= *B*).

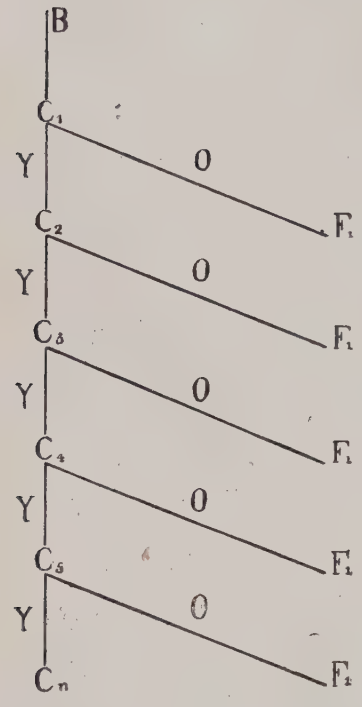


Fig. 1. — Schema della variazione continua osservata da Horne e Das Gupta. Y, micelio giovane; O, micelio vecchio. Per il resto vedasi la spiegazione nel testo.

È stata osservata la grande regolarità con cui la variazione avviene. Il raggio della coltura al 6° giorno è di mm. 6,5, dei quali il 1° mm. dal centro dà *F*, i rimanenti mm. 5,5 danno *C*. Nel giorno seguente, quando la colonia si è accresciuta di 1 mm., si aggiunge un secondo mm. alla zona centrale che dà *F*. Ad ogni mm. di aumento del raggio della colonia corrisponde 1 mm. di aumento del raggio della zona di F. Quando l'accrescimento della coltura si arresta, anche la facoltà di dare origine alla forma *C* si arresta mentre continua ad aumentare la zona di *F*. È risultato che la dominanza di una o dell'altra forma in una stessa coltura è in dipendenza della concentrazione dell'acidità del substrato nutritivo.

La temperatura influisce solo indirettamente l'originarsi della variazione, giacchè viene accelerato o ritardato il metabolismo del fungo. Così a 25° C., che è la temperatura *optimum* per la razza in esperimento, e l'attività metabolica è in un grado massimo, la condizione interna che determina la variazione è raggiunta più rapidamente, mentre a temperatura assai bassa, con attività metabolica molto debole, la variazione è più lenta a manifestarsi o non avviene del tutto.

Applicando alle colonie della forma *F* il metodo del prelevamento del micelio vecchio e di quello giovane non si ottengono, col trapianto, colonie di due tipi diversi, ma di un solo tipo, eguale alla

colonia originaria. L'età dunque nel caso del micelio di *F* non ha alcun effetto riguardo a un'eventuale variabilità. È stato però osservato, come è stato detto più sopra, un caso di variazione brusca in una colonia di *F*. Il settore variante aveva tutti i caratteri di *C*.

Horne e Das Gupta sono indotti, dai fatti suesposti ad attribuire a una simile forma di variazione una natura ciclica. Dalla forma *B*, derivata da un frammento di ifa, è stata ottenuta la forma *C*, a variazione perenne, per cui si origina la forma *F* (= *B*), la quale a sua volta può variare bruscamente, a settore, ripetendo la forma genitrice *C*. Queste due variazioni possono esser considerate come complementari, nel ciclo unico della variabilità della razza studiata, secondo due tipi diversi: nel caso di *C* il prodotto della variazione non può essere riconosciuta come un'entità separata nella coltura della forma genitrice, mentre in *F* la variazione è manifesta con l'apparire di un settore ben distinto dai caratteri della rimanente colonia. In *C*, inoltre, la variazione avviene regolarmente in ogni generazione a una determinata età, mentre in *F* la variazione non dipende dall'età e non può esser prevista, almeno allo stato attuale delle nostre nozioni su questi fenomeni.

Wiltshire, coltivando un'*Alternaria* ha ottenuto per variazione brusca una forma riferibile al genere *Stemphylium*. Ogni sospetto che il fatto sia attribuibile ad impurità della coltura originaria deve essere escluso. A Wiltshire non è riuscito di ottenere dalla forma di *Stemphylium* un ritorno a quella di *Alternaria*. Data però la relativa brevità del tempo impiegato in questi tentativi non esclude la possibilità che per variazione brusca lo *Stemphylium* possa dare origine all'*Alternaria*, meno stabile. È questo il primo esempio dell'originarsi, per variazione improvvisa, di una forma riferibile a un genere diverso da quello a cui appartiene la forma originaria. È ben vero che in un sistema puramente artificiale di classificazione, come è quello degl'ifomiceti, i limiti fra genere e genere possono avere un valore relativo, ma ciò non toglie che sino ad ora niente autorizzi a considerare la forma conidica di *Stemphylium* come una forma metagenetica appartenente ad uno stesso ciclo biologico a cui appartenga anche l'*Alternaria*. Ciò che induce a ritenere che si tratti di una variazione brusca, e non di una fase di sviluppo, è la marcata differenza nella rapidità di accrescimento che distingue il micelio dell'*Alternaria* da quella del settore dello *Stemphylium*. Senza dubbio non può escludersi che si tratti di una variazione dovuta a una disgiunzione vegetativa di un ibrido fra i due generi originatosi an-

che in epoca remota o a una dissociazione di una forma originatasi per semplice fusione di due miceli appartenenti ai generi suddetti.

Christensen ha voluto sperimentare l'influenza della temperatura sulla frequenza delle variazioni brusche nell'*Helminthosporium sativum*. Egli ha trovato che la temperatura moderatamente elevata induce o per lo meno favorisce le variazioni. Fra 25 e 30° C. comparisce il maggior numero di queste, mentre non ne sono state osservate a temperature basse o relativamente elevate. Christensen pensa che in tali condizioni esse si trovino forse sotto una forma non manifesta. In questi ultimi anni egli ha osservato centinaia di settori varianti e molti di essi sono stati isolati, coltivati e studiati attraverso generazioni cloniali. Molte di queste forme sono rimaste nettamente differenti dalla forma genitrice per quasi quattro anni, alcune sono ritornate al tipo originario. I caratteri colturali di tutte le forme sorte per variazione brusca e fatte vivere per un tempo più o meno lungo sull'ospite vivo, sono rimasti immodificati. Anche il potere patogeno è rimasto immutato. Questo modo di comportarsi, secondo Cristensen, è in appoggio all'opinione che le forme originatesi per variazione brusca rappresentano delle vere mutazioni e non dei semplici cambiamenti fenotipici.

La variabilità delle forme appartenenti al genere *Fusarium* è stata oggetto recentemente di nuove ed accurate ricerche. Mitter, nel corso di ricerche comparative su diverse specie di *Fusarium*, ha ottenuto numerose viariazioni improvvise da razze di *F. sulphureum*, *F. polymorphum* e *F. culmorum*. Le forme originatesi per variazione possono presentare notevole divergenza dalla razza originaria. La forma delle spore, la colorazione del substrato, la formazione di clamidospore e la loro disposizione, la presenza o assenza di microconidi, ecc., caratteri che comunemente sono presi come dati diagnostici per la sistematica dei *Fusarium*, sono oltremodo variabili, ed alcune forme varianti derivate da una razza appartenente ad una data sezione, possono presentare caratteri morfologici appartenenti ad altra sezione. Così una forma $C\ Y_3$ con caratteri della sezione *elegans* e $C\ Y_4$ con caratteri della sezione *discolor* derivavano dal *F. culmorum*. In generale le forme originatesi per variazione presentano una minor virulenza delle rispettive razze genitrici. Relativamente al potere patogeno, si deve ricordare qui che Harvey ha dimostrato che la virulenza nei *Fusarium* è per lo più in correlazione con alcuni caratteri morfologici. Così un grado massimo di virulenza si riscontra nelle forme a grande sviluppo di micelio. Le razze

a tipo « sporodochiale », « pionnotale » e « a spore lunghe » presentano una virulenza rispettivamente decrescente. Tu Chih ha trovato una minore virulenza in una forma sorta per variazione brusca a 27° C., dal *Fusarium culmorum*. Essa differisce dalla razza genitrice pel tipo e rapidità di accrescimento del micelio e per la produzione di pigmento ed anche per una minore produzione di spore.

Leonian ha pubblicato l'anno scorso un poderoso lavoro sopra la variabilità dei *Fusarium*. L'importanza del lavoro non sta tanto nelle numerose e minuziose ricerche di genetica, fisiologiche e morfologiche eseguite sopra 96 differenti stipiti appartenenti a numerose specie e varietà, quanto nella lunga e documentata discussione con cui i propri risultati e quelli ottenuti da altri ricercatori sono commentati. Di una simile discussione farò un esame dettagliato parlando della natura e del significato biologico delle variazioni brusche. Ora riassumo solo i risultati delle ricerche sperimentali.

Durante il corso di queste in alcune colonie è comparsa la formazione di settori. Le forme nuove così originatesi sono rimaste, alcune, sempre diverse dal tipo materno, altre hanno mostrato reversione, altre costante fluttuazione. In tutto Leonian ha studiato 220 colture. E di ciascuna di queste sono state prese in considerazione i seguenti caratteri: andamento dell'accrescimento delle colonie, produzione di pigmento, sporificazione, effetti della temperatura, effetti di diverse sostanze tossiche, di acidi organici. Tutte le esperienze fatte dimostrano che non solamente specie differenti, ma anche alcune forme e stipiti varianti della stessa specie manifestano reazioni differenti alle diverse condizioni del mezzo. Tuttavia Leonian ha trovato che molte forme e alcune delle rispettive specie spesso presentano reazioni del tutto simili. Cosicchè egli crede di poter concludere che nonostante la grande variabilità, l'incostanza di certi caratteri morfologici e fisiologici, e la comparsa di numerosi caratteri nuovi in molti *Fusarium*, una certa linea di comportamento specifico persiste in tutte le razze e forme varianti di una data specie. Il comportarsi della specie può esser rappresentato da una linea a zig-zag, che non eccede l'orbita specifica, almeno da quanto risulta dalle ricerche di Leonian.

Questo stesso Autore in questi ultimi mesi ha dato notizia di altre indagini compiute sul *Fusarium moniliforme*, isolato da piante di *Zea Mays* presentanti sintomi di *mal del piede*. Da colture monosporogenite sono state isolate 50 forme varianti da un solo stipite. Dopo aver scartato i tipi meno distinti, rimanevano 25 forme ori-

ginatesi per variazione, ben distinte fra loro per i caratteri microscopici e talune per il loro grado di patogenità. La stabilità dei diversi tipi è però risultata relativa e molto variabile, giacchè spesso un variante si dissociava in due nuovi tipi, o ritornava alla forma originaria senza alcuna regolarità.

Interessante è il fatto che mescolando artificialmente le colture di forme distinte, ordinariamente ne avveniva una fusione perfetta e le colonie che risultavano da questa riassociazione artificiale ripetevano poi la dissociazione che si osserva in natura. Quando una forma colorata in purpureo era mescolata con una forma di colore arancione, si verificava una così perfetta fusione che occorreva la selezione ripetuta per molte generazioni prima di separare le due forme. In un altro caso la fusione era così intima da dare origine a un nuovo tipo intermedio fra le due forme associate e che non era mai stato osservato precedentemente. E questi nuovi tipi hanno conservato i loro caratteri malgrado la selezione continuata per numerose generazioni. Questi fatti, che hanno una particolare importanza per chiarire la natura di molte variazioni brusche nei funghi, erano già stati osservati in precedenza da altri micologi in altri funghi. Così Burgeff (1914-15) aveva ottenuto sperimentalmente un micelio derivato da fusione di ife di due tipi distinti *(mixochimera)*.

Le ricerche sulle variazioni sin qui riassunte sono state eseguite senza riferimento alcuno all'evoluzione nucleare del fungo sottoposto all'osservazione. È ben vero che negl'ifomiceti, sui quali le indagini sono state più comunemente portate, molto spesso manca lo stadio ascoforo o basidioforo e quindi inevitabilmente viene a mancare il mezzo di studiare i rapporti che la variazione può avere con la riproduzione sessuale o per lo meno con l'alternarsi dell'aplofase con la diplofase, ma non mancano fra gl'ifomiceti, anche fra quelli studiati, dei funghi che presentano un ciclo vitale completo.

Senza dubbio la causa di molte variazioni brusche può esser costituita da una conseguenza postuma di un'ibridazione e lo studio dei caratteri e del comportamento dei nuclei potrebbe fornire elementi utilissimi per definire la natura della variazione.

Un esempio di simili ricerche è costituito dal recente lavoro di Stakman, Christensen e Hanna sopra la variazione dell'*Ustilago Zeae*. Questa specie sembra essere geneticamente molto instabile, giacchè le variazioni brusche avvengono con sorprendente frequenza in alcune linee derivanti ciascuna da un solo sporidio, e che evidentemente sono cloni aploidi. In altre linee invece si ha una maggiore

stabilità. Durante nove mesi sono stati prodotti da una sola linea circa 100 varianti differenti e più di 70 da un'altra. Che questi varianti non sieno semplici fenotipi temporanei è dimostrato dalla loro costanza, e che essi non sieno neppure il risultato di una segregazione normale è indicato dalle ricerche citologiche e genetiche. Questi varianti differiscono dai loro genitori e fra di loro in uno o più dei caratteri morfologici, colturali, del sesso e nella capacità patogena. La frequenza delle variazioni può essere influenzata da alcune condizioni dell'ambiente e certi substrati nutritivi sono più adatti a determinare differenze fra i varianti.

Stakman, Christensen e Hanna considerano queste variazioni come vere mutazioni. Lo stesso Stakman, in collaborazione con Levine e Cotter, ha studiato la possibilità dell'ibridazione fra forme diverse della *Puccinia Graminis*, dopo i fatti posti in luce da Craigie e confermati da Hanna.

Dall'incrocio fra *P. Graminis Agrostis* e *P. Graminis Tritici* forma 36, che è relativamente omozigote, sono state ottenute parecchie linee che sono differenti patogenicamente dai due genitori. Due di queste mai vennero riscontrate in natura. Varietà e forme fisiologiche di *P. Graminis* sono cloni diploidi che rimangono costanti nello stadio urediale, eccetto che per variazione brusca o mutazione. Essi però possono perdere la loro identità a causa della segregazione che si verifica, come è noto, nel promicelio della teleutospora o passando attraverso il crespino a causa dell'originarsi di una nuova diplofase nei picnidi o negli ecidi. Resta così confermata in modo definitivo la parte che al crespino era stata attribuita nella produzione di nuove forme. Evidentissima è risultata la variazione nelle proprietà parassitarie. In una coltura dello stato di uredo di *P. Graminis Tritici* forma 1, costante patogenicamente per 13 anni, subitaneamente è comparso uno stipite variante, differente patogenicamente dalla forma originaria. Numerose inoculazioni hanno dimostrato la sua costanza. È quindi ben ammissibile che nelle ruggini dei cereali nuove forme fisiologiche e specializzate nel loro parassitismo, sieno sorte sia per ibridazione, sia per variazione improvvisa.

Interessanti sono le ricerche di Dodge su variazioni della *Neurospora sitophila* in rapporto alla formazione delle ascospore. Gli aschi derivati da colture nelle quali sono mescolate le forme Arl. 6 e Arl. 10 non sono tutti equivalenti. Alcuni producono spore che differiscono solamente per il sesso e tutte e otto producono micelio che forma normalmente conidi monilioidi. Altri aschi invece pro-

ducono quattro diverse sorta di spore, due di ciascuna sorta. Le spore differiscono non solo per il sesso, ma anche pel tipo di micelio a cui danno origine. Due spore di ciascun sesso danno origine a mi-

Fig. 2. — A-E = Diagrammi dei diversi aschi del peritecio di *N. sitophila* (eterotallica) mostranti che i fattori per il sesso e per i conidi sono segregati indipendentemente fra loro nella prima o nella seconda divisione nucleare.

Le ascospore (aplonti) bianche sono del sesso A, quelle nere sono del sesso B. La punteggiatura indica che nelle ascospore è presente il fattore per i conidi. Le ascospore senza punteggiatura danno origine a micelio senza conidi (albino). E = Diagramma dell'asco del peritecio di *Neurospora tetrasperma* (omotallica) mostrante che ciascuna ascospora (diplonte) contiene i fattori per i due sessi e per i conidi. (Da Dodge).

celio albino che è sterile, cioè non produce conidi monilioidi. Due altre spore di ciascun sesso danno la forma tipica e cioè il loro micelio sviluppa conidi colorati in arancione. In simili aschi le spore

possono essere alternate 2 a 2 secondo il sesso e 4 a 4 col carattere albino in contrasto con quello della forma tipica, oppure possono essere alternate 4 a 4 per il sesso e 2 a 2 per il carattere albino e per il carattere tipico. La particolare distribuzione delle spore nell'asco dipende dal fatto che i fattori ereditari del sesso ed i fattori ereditari dei caratteri conidiali sono segregati, ora durante la prima divisione del nucleo dell'asco, ora durante la seconda. La figura qui unita rappresenta i due modi diversi di distribuzione delle spore nell'asco. La nuova razza può esser propagata indefinitivamente con la riproduzione sessuata. Il carattere albino preesisteva nel micelio delle due forme, le quali possono presentare contemporaneamente due tipi di micelio, quello tipico e quello albino.

Una coltura della forma Arl. 10, derivata originariamente da una singola ascospora, ha sviluppato due sorta di conidi monilioidi. Conidi di una sorta danno origine a un micelio che forma conidi normali, gli altri conidi, come risultato di una variazione brusca o per segregazione somatica, sviluppano micelio albino, che è del tutto simile al micelio albino derivato dalle ascospore in seguito alla segregazione che avviene durante la divisione di riduzione nell'asco. Cosicchè dunque uno stesso carattere (micelio albino) può comparire separatamente come una variazione determinata dalla segregazione che si verifica in seguito alla riproduzione sessuale, e casualmente come una variazione somatica.

Le ricerche che ora ho terminato di riassumere non sono tutte quelle che sulla variabilità dei funghi sono state eseguite in quest'ultimo ventennio, ma fra di loro sono alcune delle principali e possono ritenersi sufficienti per dare un'idea dei risultati raggiunti in questo campo della microbiologia (1).

La ristrettezza del tempo mi ha impedito di trattare diffusamente, come ne avevo l'intenzione, la variabilità nei batteri, e devo quindi limitarmi a riassumere solo qualche lavoro e a prenderne altri in considerazione nella discussione generale sulla natura delle varie forme di variazione. D'altra parte io desidero limitare la mia rela-

(1) Desiderando limitarmi, nella presente relazione, alle variazioni brusche, settoriali delle colonie dei funghi, non ho fatto alcun cenno delle ricerche eseguite sulle variazioni dei protozoi (Jennings, 1920-23; Jollos, 1924; Calkins, 1926); delle alghe (Pascher, 1916, 1918; Transeau, 1919; Hartmann, 1925; Woronichin, 1926; Chodat 1926); degli actinomiceti (Lieske); ed infine delle vecchie ricerche sulle erisifacee (Salmon, 1900, 1905); sulle ruggini (Eriksson e Marshall Ward, 1894-1905), sulle mucoracee (Blakeslee, 1906 e Namylowski 1906).

zione sulla variabilità dei batteri considerata da un punto di vista botanico.

Le ricerche sulle variazioni presentate dai batteri nei mezzi colturali sono assai più numerose di quelle eseguite sui funghi, ma le ricerche che hanno posto in evidenza il comparire improvviso di settori varianti nella colonia di una determinata forma non sono molte.

Fra le più recenti sono da citare le constatazioni fatte da Nirula coltivando la *Pseudomonas campestris,* parassita del cavolo e altri batteri patogeni per piante diverse. Tutte le colture, derivate da singole cellule isolate col metodo di Burri all'inchiostro di China, hanno presentato la comparsa di settori indipendentemente dalle condizioni del mezzo.

Le nuove razze così originatesi sono state coltivate partendo da singole cellule in un substrato nutritivo di egual composizione di quello usato per le forme originarie, ma anche variandone la composizione e variando tutte le altre condizioni dell'ambiente, i caratteri nuovi sono rimasti immutati per tutto il tempo in cui le colture sono state sottoposte all'osservazione. Nessuna reversione è stata constatata e tutti i tentativi fatti per provocarne qualcuna artificialmente sono falliti. I caratteri morfologici, fisiologici e sierologici varianti rientrano nei limiti delle singole specie.

Ramchandani, l'anno scorso, ha descritto un'interessante variazione improvvisa nel *Bacillus prodigiosus.* In una colonia di questo bacillo, dal caratteristico color rosso, è comparso un settore completamente bianco. La forma bianca, a sua volta, ha presentato una variazione brusca, dando origine a un'altra forma bianca più trasparente. La prima forma bianca si è mostrata costante nei suoi caratteri morfologici, fisiologici e sierologici rispetto a quelli della forma originaria. Le due forme bianche sono rimaste costantemente prive del pigmento per 9 mesi durante i quali sono state sottoposte a vari stimoli chimici e all'inoculazione nei topi. La seconda forma bianca ha perduto il potere patogeno per questi animali. Sopra le colonie vecchie, normali, che sono state private del colore mediante una temperatura elevata, si formano piccole colonie secondarie, rosse, determinate dallo sviluppo di poche cellule della vecchia colonia che hanno conservato la facoltà di ripordursi. Non si tratta quindi di una variazione.

Potrei citare ancora molti esempi di variazioni improvvise nei batteri, come quelle osservate da Burri e Düggeli nel *B. imperfectum,* del gruppo *coli-thyphosus,* o quelle riferite da altri batteriologi, ma

la loro descrizione non servirebbe minimamente a svelare le cause intime di simili variazioni e il loro significato biologico.

È piuttosto necessario scindere nettamente questa forma di variazione settoriale delle colonie derivate da una sola cellula da quelle variazioni dei batteri già note da lungo tempo e che sono state oggetto di numerose ricerche e di ripetute discussioni. Voglio alludere a quelle variazioni che rappresentano delle modificazioni temporanee sotto l'influenza delle condizioni dell'ambiente, o a quelle variazioni che si originano nelle colture derivate da più cellule e quindi attribuibili all'impurità genetica del materiale adoperato per il trapianto. Oggi siamo tutti d'accordo sulle conclusioni che circa 12 anni fa Cole e Wright esposero sopra un tale argomento, che cioè entro l'ambito di una specie batterica, anche la meglio conosciuta e delimitata, vi sono varietà e razze naturali, ciascuna con propri caratteri e un dato grado di variabilità, perpetuabili in coltura pura indipendentemente dalle condizioni ambienti. Dopo che il concetto di *linea pura* è stato introdotto da Johansen nelle ricerche della genetica, un simile tipo di variabilità delle colonie derivate da più cellule presenta un interesse secondario anche in batteriologia, giacchè le attuali ricerche si sono rivolte a colture cloniali, a colture cioè che derivano da una sola cellula. Naturalmente se in queste colture si manifesta una variazione con la formazione di un settore non potremo più parlare di variazione dovuta a mescolanza di razze o di biotipi, ma solo di variazione dovuta a fattori interni, per cui potranno esser segregate nuove forme o razze o potranno separarsi razze che erano state fuse insieme dall'ibridazione.

Questo tipo di variazione rientra completamente fra molte di quelle dei funghi più sopra riassunte, cosicchè molte delle cose, che saranno dette sulla natura genetica di quest'ultime variazioni, varranno oltre che per i funghi anche per i batteri.

II. La natura genetica e il significato biologico delle variazioni brusche dei microrganismi. — È necessario prima di tutto considerare quale valore la genetica applicata ai funghi e ai batteri possa accordare alle colture monosporogenite o cloniali, come mezzo per ottenere un microrganismo allo stato di *purezza*, o di una costituzione genetica ben definita.

Nelle esperienze di genetica sulle piante superiori si procede alla riproduzione per seme dopo aver ottenuto il seme stesso in particolari condizioni (autofecondazione, ibridazione, ecc.) per cui noi

sappiamo con una certa sicurezza il punto di partenza delle nostre esperienze. Nel caso dei funghi e dei batteri sarebbe impossibile ricorrere a un simile metodo per quelli di loro che non presentano in coltura la riproduzione sessuale, per gli altri solo in questi ultimi anni si è incominciato a studiarne la sessualità e le modalità di alternanza dell'aplofase con la diplofase. Le nozioni che abbiamo a un tal riguardo, e relativamente ai funghi superiori, fanno intravedere tutte le difficoltà tecniche che occorre superare per ottenere, per es., da un eumicete eterotallico, con la riproduzione sessuale, un discendente che provenga da due ascospore di sesso opposto. E quando si pensi che vi sono specie sessualmente multipolari, che possono produrre anche quattro tipi di spore sessualmente diverse, si potrà facilmente comprendere, quali cure e quali fatiche richieda lo studio genetico su colture separate dei discendenti ottenuti mercè le combinazioni dei quattro tipi di aplonti.

Alcuni micologi hanno constatato con sorpresa che non tutti i conidi di una stessa colonia sono equivalenti fra loro relativamente al micelio che deriva dalla loro germinazione. Le ricerche citologiche di Dodge hanno dimostrato la possibilità che da un micelio omotallico, nella medesima coltura, si originino conidi unisessuali oltre a quelli normali bisessuali. Il fatto è dovuto probabilmente a una separazione dei due nuclei di uno stesso *dicarion* durante la divisione accidentalmente non simultanea. È dunque spiegabile come anche per altri caratteri, oltre quelli della sessualità, i conidi di una stessa coltura, anche se derivata da una sola spora, possano essere fisiologicamente e quindi potenzialmente diversi fra loro. Nei batteri, nei quali almeno apparentemente esiste un minor differenziamento fra cellule vegetative e cellule destinate alla riproduzione gamica, le difficoltà di conoscere le vere condizioni genetiche dello stipite su cui instituiamo le nostre esperienze non sono minori, a causa delle piccolissime dimensioni degl'individui che non ci permettono di riconoscere con sicurezza caratteri differenziali nelle cellule destinate a diventar organi della riproduzione. Nei funghi, solo con lo studio citologico dell'evoluzione nucleare nel ciclo vitale dell'individuo, siamo riusciti a far luce sull'oscura e complessa questione della loro sessualità. Nelle esperienze, comunemente eseguite sulla variabilità dei microrganismi, si ricorre, spesso per necessità, allo studio delle successive generazioni ottenute con la riproduzione vegetativa. Si deve ora considerare che il valore che noi possiamo accordare all'ereditarietà dei caratteri in questo tipo di riproduzione

è ben diverso da quello che noi potremmo accordare all'ereditarietà in discendenti da un unico stipite a riproduzione sessuata. Nel primo caso noi potremo ammettere assai facilmente l'ereditarietà di caratteri acquisiti, nel secondo caso la questione, come è noto, è ben lungi dall'esser risolta.

Queste brevi considerazioni critiche erano necessarie prima di discutere le varie opinioni sulla natura genetica delle variazioni brusche che avvengono nelle colture derivate da un'unica spora o cloniali (1).

Le opinioni espresse dai microbiologi a questo riguardo sono le più diverse e si possono riunire in più gruppi nell'ordine seguente, secondo che le variazioni possono essere considerate come:

a) modificazioni (2) o somazioni provocate da fattori dell'ambiente e quindi facilmente reversibili;

b) variazioni spontanee, improvvise, poco divergenti dal tipo

(1) Una rivista critica delle diverse ricerche eseguite nell'ultimo ventennio sopra le variazioni dei funghi e dei batteri è stata presentata dal Prof. W. B. Brierley al Congresso internazionale di Botanica tenuto ad Ithaca (Stati Uniti di America) nel 1926. L'eccezionale ritardo con cui sono stati pubblicati gli Atti di quel Congresso, non mi ha permesso di leggere quella rivista che al momento della correzione delle bozze di stampa della presente relazione, per cui non mi è possibile di riferirne diffusamente come l'importanza del lavoro meriterebbe.

Brierley, dopo aver accennato sommariamente allo stato presente delle ricerche sulle variazioni presentate dai microrganismi, definisce da un punto di vista critico i concetti e la terminologia delle diverse sorta di variazioni nei vari gruppi di organismi oltre che nei funghi e nei batteri. L'A. classifica i fenomeni di variazione descritti da due punti di vista: 1° in base a criteri morfologici e fisiologici i dati che ai fenomeni stessi si riferiscono possono essere considerati secondo un valore fenotipico; 2° in rapporto invece ai fattori della comparsa di questi fenomeni e del loro modo di comportarsi, i dati raccolti possono esserle considerati secondo il valore genetico. L'A. discute le eventuali correlazioni fra i due sistemi di classificazione. I diversi tipi di variazione dei funghi e dei batteri, classificati secondo una base genetica, sono trattati in relazione al processo di accrescimento e di riproduzione in questi due gruppi di microrganismi; non sono tralasciati i tipi aberranti di fenomeni genetici. Infine l'A. tratta dell'avvenire e dell'indirizzo delle ricerche di genetica applicate ai funghi e ai batteri, le possibilità ed i limiti di tali ricerche. L'idea dominante, a cui è informata la rivista critica di Brierley, è che le variazioni dei microrganismi sono in prevalenza delle *modificazioni* o delle *segregazioni somatiche* che avvengono in forme eterozigote o disgiunzioni di individui originatisi per semplice fusione di due tipi distinti. Le variazioni *spontanee*, dovute a cambiamenti più o meno profondi della costituzione genetica, sono eccezionalmente ammesse da Brierley, o, per lo meno, ritenute con molta ragione, difficilmente dimostrabili.

(2) Qui la parola *modificazione* è usata nel senso comunemente accettato nella genetica botanica (Baur), e cioè equivale a variazione somatica, che si origina sotto l'influenza di condizioni esterne.

originario, prodotte da fattori interni ereditarie vegetativamente e stimolate o favorite da condizioni dell'ambiente;

c) mutazioni gemmari o vegetative, *bud-sportings,* ereditarie soltanto con la riproduzione agamica;

d) mutazioni dell'idioplasma, ereditarie quindi anche con la riproduzione sessuale;

e) dissociazioni di forme originatesi per la fusione vegetativa di due forme fra loro diverse;

f) segregazioni vegetative da forme eterozigote;

g) dissociazioni di fasi diverse del ciclo vitale del microrganismo;

h) variazioni più o meno durevoli indotte da azione parassitaria.

Esaminerò ora una ad una queste diverse interpretazioni che si possono dare della natura genetica delle variazioni brusche; ma, come si vedrà, in molti casi queste diverse interpretazioni non si escludono a vicenda, piuttosto, potendo interferire in uno stesso variante due o più tipi di variazione, non si può fare a meno nel trattare di un dato tipo di considerarlo anche in rapporto all'eventuale sua interferenza con altri tipi di variazione.

a) *Modificazioni o somazioni provocate da fattori dell'ambiente e quindi facilmente reversibili.* Rientrano in questa definizione tutte le variazioni progressive che spesso corrispondono ad un adattamento alle variate condizioni del mezzo e così pure vi rientrano quelle variazioni brusche determinate da particolari stimolazioni di natura fisica o chimica dovute a proprietà del mezzo colturale e che sono prodotte artificialmente dallo sperimentatore. Naturalmente questa sorta di variazione comparisce non con la formazione di un settore nella colonia, ma con la modificazione dei caratteri morfologici e fisiologici di tutta la colonia, sia durante lo sviluppo di questa, sia nei successivi trapianti. I caratteri nuovi durano sino a che non cessino le condizioni eccezionali che li hanno originati o, più raramente, si conservano più o meno a lungo anche dopo che il microrganismo è sottratto alla stimolazione appropriata. Sino ad ora non si può parlare in questi casi di ereditarietà di caratteri acquisiti, giacchè le esperienze sono state eseguite sempre con microrganismi che nelle colture si riproducono agamicamente. Sono attribuibili a questa ca-

tegoria di variazioni alcune di quelle descritte da Brown e da Horne per il tipo di accrescimento del micelio di numerose razze di *Fusarium* in relazione a proprietà del substrato nutritivo e a fattori dell'ambiente, come luce e temperatura. Non sono da interpretarsi come semplici modificazioni le variazioni descritte da Chandhuri relativamente al *Colletotrichum biologicum*, giacchè se gli stipiti varianti, trapiantati sul substrato primitivo, sono ritornati alla forma tipica originaria, l'azione del substrato nel provocare la formazione del settore ha agito solo come fattore *rivelatore* della variazione per una diversa influenza che la qualità del nutrimento esercita sopra la forma originaria e quella variante. Si ha in questo caso l'interferenza di una *modificazione* con un altro tipo di variazione. Rientrano forse fra le modificazioni alcune delle variazioni osservate da Stevens nell'*Helminthosporium*, dalla Haeniche nel *Penicillium*, sotto l'influenza di sostanze tossiche, e quelle constatate da numerosi altri micologi. In simili casi si trattava dunque di fluttuazioni temporanee determinate da particolari proprietà del substrato nutritivo. Naturalmente il semplice ritorno alla forma materna non può costituire, da solo, una prova che una data variazione sia una modificazione o somazione, giacchè esistono molte forme varianti originatesi per mutazione vegetativa o per segregazione, le quali possono presentare una reversione in seguito all'azione di fattori interni, senza che sia avvenuto alcun cambiamento nelle condizioni del mezzo [1].

b) *Variazioni spontanee, improvvise, poco divergenti dal tipo originario, prodotte da fattori interni, ereditarie vegetativamente e stimolate o favorite da condizioni dell'ambiente.* In questa categoria, certamente ancora caotica, è compresa la maggior parte delle *variazioni a salti (saltations* di Stevens) e *dissociazioni*, (Leonian).

Queste variazioni si manifestano nelle colture monosporogenite con la formazione di settori più o meno differenziati dalla forma originaria, che di solito costituisce la porzione maggiore della colonia, almeno sino ad una certa età della colonia stessa, giacchè in molti casi il settore variante, per un accrescimento più abbondante e più rapido del micelio aereo, può prendere sviluppo preponderante e

---

(1) Fra le modificazioni, intese in senso lato, sono in gran parte da comprendere anche i tipi di *variazione continua (adattativa* e *non adattativa)* definiti da Brierley. In ultima analisi si tratta di variazioni che avvengono sempre in dipendenza diretta o indiretta delle condizioni del mezzo, complicate spesso dall'ereditarietà vegetativa dei caratteri temporaneamente acquisiti.

venire a nascondere quasi completamente la parte della colonia che è data dalla forma originaria. Una stessa colonia può presentare anche due o tre settori distinti fra loro.

Generalmente l'origine dei settori corrisponde con la regione centrale della colonia, ma in molti casi i settori si originano anche a una certa distanza dal centro. È stato constatato che la regione più adulta delle colonie è quella che dà origine più facilmente a stipiti varianti. L'influenza delle proprietà del substrato colturale è solo indiretta. Secondo Brown sopra un substrato a base di glucosio, asparagina e sali minerali a debole concentrazione le variazioni avvengono assai raramente, sopra un substrato con le stesse sostanze nutritive molto concentrate, le variazioni sono relativamente frequenti.

L'interpretazione che si è data a questo fatto è la seguente: qualunque sia la causa dell'inizio della variazione e in qualunque parte della colonia avvenga il primordio dello stipite variante (inizio della *dissociazione*, secondo Leonian), è necessario un ulteriore periodo di accrescimento prima che esso acquisti un'estensione tale da permettere di essere constatato o di esser trapiantato. Se ora il substrato nutrivo è tale che l'accrescimento del micelio entro la compagine della colonia si arresti presto, nessun primordio di variante potrà svilupparsi in modo visibile. Cosicchè secondo Brown tutti i substrati colturali, che permettano un accrescimento vigoroso e continuo per un tempo relativamente lungo, favoriscono l'estrinsecazione dei settori varianti.

Questa interpretazione non sembra però applicabile a tutti i casi osservati giacchè altri sperimentatori come Chodat, Curzi ed altri hanno trovato che le variazioni sono favorite anche da una scarsità di nutrimento. D'altra parte Christensen ed altri hanno dimostrato che è la esigua quantità del substrato nutritivo che favorisce la maggior frequenza delle variazioni. In altri casi alcune sostanze tossiche hanno dimostrato di esercitare un'azione stimolante sullo stipite variante. È molto probabile che talvolta si tratti degli effetti di un'interferenza di una somazione con una variazione per fattori interni. Infatti l'azione del mezzo produce i medesimi effetti su tutte le parti di una colonia a condizione che questa sia del tutto omogenea, l'originarsi di una variazione con caratteri fisiologici diversi determina da parte del variante una risposta, alla stimolazione esterna, diversa da quella del rimanente della colonia per cui si rende visibile il settore variante per i caratteri morfologici di-

versi che si estrinsecano solo in quelle date condizioni di coltura. In simili casi evidentemente la variazione può scomparire apparentemente sopra alcuni substrati, rimanendovi allo stato latente.

In qualche caso è la temperatura che costituisce il fattore rivelatore della variazione o che ne stimola l'estrinsecazione, come hanno dimostrato Tu Chih e Christensen. Secondo Horne e Das Gupta la temperatura influenza solo indirettamente l'iniziarsi della variazione affrettando o ritardando l'attività metabolica del microrganismo. Alla temperatura ottimale la variazione è più frequente, alle temperature che stanno sopra o sotto l'optimum la variazione è meno frequente, a temperatura molto bassa, quando l'attività metabolica è quasi arrestata non si osservano variazioni.

La questione dell'influenza dei fattori esterni sull'estrinsecazione delle variazioni brusche ed ereditarie vegetativamente è stata diffusamente trattata da Leonian nelle sue ricerche sulla variabilità dei *Fusarium*. Egli parte dal fatto, già dimostrato, che le cellule di un micelio, sieno esse cellule di ife, sieno esse dei conidi o altri organi della riproduzione vegetativa, non sono tutte fra loro perfettamente identiche, morfologicamente e fisiologicamente. È anche possibile ammettere che persino le diverse parti del protoplasma di una singola cellula non siano del tutto equivalenti fra loro per ciò che riguarda le ulteriori possibilità del loro sviluppo. Leonian ritiene, per analogia con i fatti posti in luce primieramente da Löhnis e Smith nei batteri, che anche nei funghi ciascuna specie, ciascuna varietà e ciascuna razza sia costituita nel proprio ciclo vitale da diverse fasi, distinte fra loro da caratteri morfologici e fisiologici. Ciascuna di queste fasi può essere dissociata dallo stipite, che la conteneva in uno stato latente, dall'azione di stimoli appropriati dell'ambiente. I fattori interni che dalle loro differenti combinazioni producono i caratteri di una data specie o di una data varietà o razza, possono esser soggetti a costanti o periodiche segregazioni o ricombinazioni in alcune cellule piuttosto che in altre [1]. La rapida proliferazione di una di tali cellule può dare origine a un settore con caratteri morfologici e fisiologici distinti da quelli del rimanente della colonia.

---

[1] Come è stato riferito nella prima parte di questa relazione, Horne e Das Gupta hanno realmente dimostrato il verificarsi, ad una data età del micelio, del primordio della variazione, la quale non si manifesta nella colonia con la formazione di un settore, ma può esser posta in evidenza solo con l'isolamento e la coltura separata della porzione di micelio che porta le cellule varianti.

Inoltre, in seguito ad altre segregazioni e ricombinazioni di fattori interni, può verificarsi la reversione del variante al tipo originario o presentarsi un'altra variazione.

Secondo Leonian con queste variazioni oscillanti intorno a un tipo medio un organismo non perde né guadagna alcun carattere, solo che a causa di questo quasi costante fluttuare dei fattori interni i suoi diversi aspetti o fasi appariscono o scompariscono in dipendenza dello stimolo appropriato che ne favorisce lo sviluppo.

Leonian non ritiene che in tutti i casi le differenti fasi di una data specie o razza si trovino allo stato latente nel protoplasma delle cellule sino a che lo stimolo venga ad attivarle. È probabile che una colonia la quale sembri tutta uniforme o quando, sottoposta alle prove di laboratorio, dia reazioni uniformi, possa essere in realtà complessa ed eterogenea. Noi sappiamo, per es., che sopra mezzi opachi, come quello preparato con la farina di avena, la formazione del settore è meno comune che sopra i mezzi trasparenti; che strati sottili di agar, come è stato detto più sopra, sembrano indurre la formazione dei settori mentre strati spessi sembrano ostacolarla. Senza dubbio l'agar trasparente e sottile non costituisce per se stesso uno stimolo, ma a causa di queste proprietà fisiche l'investigatore è facilitato nella sua ricerca di piccole deviazioni del micelio dal tipo dominante nella colonia. Alcuni substrati inducono un notevole accrescimento aereo e quando un settore povero di micelio aereo incomincia ad apparire è *soffocato* sotto la vegetazione rigogliosa delle ife aeree della forma che costituisce il resto della colonia. Sostanze amilacee, come il riso, che inducono la formazione del pigmento nella maggior parte dei *Fusarium*, sono dei substrati poco indicati per la ricerca di settori formanti o non formanti pigmento, mentre un substrato sintetico, capace di indurre la formazione del pigmento in alcune varietà e impedirla in altre, serve molto meglio per un tale scopo. Ma queste sono tutte condizioni che solo apparentemente hanno un'influenza sulla comparsa delle variazioni brusche.

Come lo stesso Leonian riconosce, la natura genetica di questa forma di variazione non differisce sostanzialmente da quella che è stata chiamata nelle piante superiori *mutazione gemmare o vegetativa*. È da fare osservare però che la concezione di Leonian che considera le *variazioni a salti* come *dissociazioni* di fasi diverse del ciclo vitale dell'organismo, analogamente alla successione di fasi osservate in alcuni batteri, non è sempre conciliabile col concetto di mu-

tazione vegetativa delle piante superiori nè con quello di variazione brusca dei funghi.

Le varie forme del ciclo vitale di alcuni batteri sono forse più giustificatamente paragonabili alle diverse forme metagenetiche che appartengano ai singoli cicli vitali di molti funghi. Così è più logico trovare un'analogia fra gonidangi, gonidi, simplasmi, ecc. con le forme riproduttive secondarie dei funghi superiori. Più che una dissociazione di fasi del ciclo vitale noi dobbiamo vedere nelle *saltations* una segregazione o separazione dal tipo originario di stipiti divergenti, la cui origine, come ben dice Leonian, deriva dalle varie disgiunzioni o ricombinazioni dei fattori interni della variabilità somatica di un organismo. Il termine *dissociazione* adottato da Leonian è più appropriato a quella forma di variazione che veramente è costituita dal dissociarsi di due forme che si erano fuse in una sola *(mixochimere)*.

Dobbiamo dunque comprendere in questo secondo aggruppamento tutte quelle variazioni spontanee, per quanto la loro estrinsecazione sia stimolata e fornita da particolari condizioni del mezzo, che si manifestano bruscamente con la formazione di settori o di aree isolate nelle colture da una sola spora o cloniali, e che divergono poco dal tipo originario e che possono presentare facilmente la reversione. Esse sono ereditarie vegetativamente e le forme o stipiti nuovi, che per loro mezzo si originano, restano nell'orbita della specie. Queste variazioni diversificano dalle mutazioni vegetative propriamente dette solo per la piccola entità della divergenza dal tipo originario, per la loro frequenza e periodicità e per la più o meno facile reversione. Naturalmente non si può escludere che molte di esse non sieno che l'effetto di segregazioni vegetative da forme eterozigote [1].

c) *Mutazioni gemmari o vegetative, ereditarie quindi solo con la riproduzione agamica.* Si possono comprendere in questa categoria tutte le variazioni brusche, che si manifestano con la formazione di settori i cui caratteri divergano assai notevolmente dal tipo originario. Questo tipo di variazioni non comparisce molto frequentemente, i caratteri delle forme nuove in alcuni casi escono dai limiti specifici e si conservano stabilmente con la riproduzione agamica.

---

[1] Sono da comprendere in questa categoria molte delle *variazioni discontinue condizionate* della classificazione di Brierley.

Come è stato detto nella prima parte di questa relazione, variazioni permanenti, forse vere mutazioni vegetative, qualche volta identiche a forme esistenti in natura, vennero ottenute da Burger, Brierley, Brown, Stevens e da altri sperimentatori. L'origine di una forma di *Stemphylium* da un'*Alternaria* osservata da Wiltshire, non è forse da riferire a una mutazione vegetativa, ma piuttosto a una segregazione avvenuta in una forma originatasi per associazione di due forme distinte.

La differenza fra le variazioni brusche, alle quali noi possiamo riconoscere tutti i caratteri delle mutazioni vegetative delle piante superiori, e alcune delle variazioni comprese nella categoria precedente, non è che una differenza che concerne il grado e la stabilità della divergenza, non è quindi forse una differenza sostanziale e le due sorta di variazioni potrebbero essere riunite sotto la denominazione di variazioni discontinue (Brierley); tuttavia, in attesa che ricerche ulteriori chiariscano maggiormente la natura genetica delle variazioni meno divergenti e meno stabili, è preferibile mantenere fra loro una distinzione per quanto sia molto difficile lo stabilire dove finiscano le une e incomincino le altre. Una delle difficoltà, che ha ostacolato ed ostacola anche oggi l'attribuzione unanime della definizione di mutazioni vegetative, alle variazioni brusche e durevoli dei funghi e dei batteri, è costituita dalla nostra completa ignoranza sullo stato di *purezza* genetica dei diversi organismi che presentano tali variazioni. È noto a tutti i genetisti botanici che per poter considerare una data variazione brusca vegetativa in una pianta superiore come una vera mutazione gemmare, occorre dimostrare prima di tutto che si ha a che fare con una linea pura, con un omozigoto, altrimenti non è possibile eliminare il dubbio che si tratti di una disgiunzione di caratteri per via vegetativa in una pianta ibrida. Se in molti casi è difficile procurarsi questa dimostrazione per una pianta superiore, estremamente più difficile riesce nel caso di un fungo e di un batterio (1). Questa difficoltà è anche maggiormente da prendersi in considerazione quando si pensi alla possibilità di fusioni pura-

(1) Che anche nei batteri la formazione delle endospore sia preceduta da un processo di fecondazione (*per congiunzione* di due cellule) è ormai una nozione ben stabilita, ma che sembra di essere stata ignorata da Brown quando ha criticato l'opinione di Brierley tendente ad ammettere l'eterozigosi come causa indiretta di molte variazioni brusche di funghi e batteri. Per quanto riguarda la fecondazione nei batteri si veda Löhnis (1921-1922) e Potthoff (1924).

Almquist (1925) ha persino ibridato sperimentalmente due specie di batteri, *B. typhi* e *B. dysenteriae* ottenendo una nuova razza, il *B. diploides*.

mente vegetative di due miceli con caratteri distinti, come è stato dimostrato da Burgeff e da Leonian. La formazione di ibridi nei funghi con eterotallismo sessuale è ormai ben dimostrata e forme eterozigote devono essere comunissime in natura, per quanto, come si vedrà, una tale possibilità sia da accettarsi con molte riserve per le colture derivate da una sola spora.

Queste considerazioni devono farci accettare con molta prudenza la definizione di mutazioni vegetative per molte variazioni brusche e durevoli dei microrganismi. È forse quindi preferibile paragonare certe viariazioni brusche, ereditarie vegetativamente e non reversibili, alle variazioni gemmari *(bud-sporting)* delle piante superiori. Si tratta di un'espressione di un senso più lato e meno impegnativo.

d) *Mutazioni dell'idioplasma.* Che nei funghi e anche nei batteri possano verificarsi delle vere mutazioni idioplasmatiche, è ammissibile *a priori,* ma, come e anche più che per le mutazioni vegetative, è estremamente difficile darne una dimostrazione. Intanto questa non potrebbe cercarsi che nelle linee pure delle forme a riproduzione sessuale e con meno difficoltà nelle forme omotalliche, nelle quali però la riduzione della sessualità a un grado estremo può dare al processo di riproduzione quasi il carattere di un'apogamia.

Delle ricerche al riguardo non sono state ancora compiute.

e) *Dissociazioni di forme originatesi per la fusione vegetativa di due forme fra loro diverse.* Come è stato riferito in precedenza, variazioni dissociative sono state constatate da Leonian in forme fungine derivate dalla fusione dei miceli di due forme distinte e viventi ordinariamente separate. Questa constatazione permette di considerare la possibilità che molte variazioni settoriali delle colonie possono essere determinate da simili dissociazioni. Anche di un tal fenomeno è assai difficile procurarci la dimostrazione relativamente alle variazioni che sono presentate in coltura da forme isolate dalla natura e delle quali noi non conosciamo l'origine. Un carattere che può in qualche modo illuminarci sulla natura dissociativa di una variazione è costituito dalla repulsione o dalla mancanza di ripulsione fra lo stipite variante e la forma da cui esso si è originato. Generalmente vi è repulsione se si tratta di variazione brusca di una forma pura, non vi è repulsione se il variante deriva dalla dissociazione di una forma originatasi per associazione, ma non si può dire che si tratti di una regola sicura.

Sarebbe molto interessante studiare il comportarsi dei nuclei dei miceli aploidi nel processo di fusione, e che può paragonarsi alla *plasmogamia* che avviene fra miceli di sesso diverso nelle forme eterotalliche. In quest'ultimo caso in seguito alla plasmogamia si origina il *dicarion* nel micelio, in cui oltre al plasma è stato immesso anche il nucleo dell'ifa del micelio di sesso opposto; nel caso della associazione di due miceli aploidi si forma pure il *dicarion* nel nuovo organismo che ne risulta?

Volendo trovare un'analogia del fatto osservato da Leonian con quanto avviene nelle piante superiori le forme fungine originatesi per associazione potrebbero esser paragonate agl'*ibridi d'innesto* e come questi soggette a disgiunzioni vegetative, e tanto più tale analogia potrebbe esser giustificata se tali fusioni avvenissero fra miceli che si trovassero nella dicariofase (1). Sarebbe anche interessante stabilire in tali forme, quando dessero origine ad organi della riproduzione sessuale, in qual modo si comporterebbe il nuovo carattere nella fase aploide. Tale comportamento senza dubbio sarebbe diverso a seconda che la fusione concernesse solo il plasma o anche i nuclei dei due miceli componenti. Nel primo caso probabilmente il carattere nuovo non passerebbe negli aplonti, nel secondo caso si avrebbero aplonti col nuovo carattere ed altri che ne sarebbero privi, come in un ibrido sessuale.

f) *Segregazioni vegetative da forme eterozigote.* La variazione brusca in una colonia e riferibile a una segregazione vegetativa di caratteri che eransi originati in seguito a combinazioni nuove di fattori ereditari in un ibrido sessuale, non può verificarsi naturalmente che nelle colture della fase diploide di un organismo capace di riprodursi sessualmente. Nei batteri e in certi funghi inferiori simili condizioni sono forse più facilmente realizzabili che in molti funghi. Intanto noi dobbiamo escludere dal numero di quelli che possono presentare il tipo di variazione suddetto tutte le specie e razze omotalliche (2).

---

(1) Il termine di *mixochimere*, adottato da Brierley per queste forme sorte dalla fusione di due tipi distinti di micelio, corrisponde esattamente a questa analogia con gl'ibridi d'innesto delle piante superiori.

(2) Che anche nei funghi autogami possono avvenire variazioni per riorganizzazione nucleare, come ha dimostrato Bridges, Prel, Wilson ed altri, e come fa osservare Brierley, è cosa ormai accettata da tutti, ma in simili casi non si tratta più di segregazioni di forme derivate da combinazioni.

Per quanto concerne i funghi superiori eterotallici, naturalmente non potrà parlarsi di variazione per segregazione vegetativa di forme riunite dall'ibridazione *(combinazioni)* in quelle colture che provengono da un'ascospora o da una basidiospora, nelle quali la segregazione dei fattori ereditari è già avvenuta. Ma se noi isoliamo un micelio da una coltura dove si trovino razze o specie eterotalliche diverse e se questo micelio ha già raggiunto per mezzo della plasmogamia la fase diploide, noi potremo trovare nelle colture cloniali derivate da un tal micelio delle segregazioni vegetative delle due forme ibridatesi. Per gl'imenomiceti simili variazioni sarebbero più difficile a verificarsi o del tutto impossibili nelle colture derivate da singoli conidi o da altri organi della riproduzione vegetativa (oidi, clamidospore, ecc.), giacchè è noto, almeno per le ricerche sin qui eseguite, che i miceli eterotallici degl'imenomiceti danno origine a simili organi solo se si trovano nell'aplofase, quindi in uno stadio del ciclo evolutivo individuale in cui la avvenuta segregazione dei diversi fattori ereditari assicura della loro purezza genetica. Per gli ascomiceti invece la possibilità di presentare disgiunzioni vegetative di forme ibride anche nelle colture derivate da singoli conidi o altri organi di riproduzione agamica può essere più facilmente ammissibile, quando però si tratti di un fungo eterotallico il cui micelio si trovi nella fase diploide.

Queste considerazioni erano necessarie per dimostrare la necessità di particolari cautele e ricerche prima di poter stabilire, con qualche probabilità di non errare, che certe variazioni brusche sono riferibili a segregazioni vegetative di forme eterozigote.

È dunque da far osservare che non è indifferente adoperare, per studiare le variazioni brusche, delle colture derivate da un singolo aplonte o diplonte o da una o più cellule vegetative, giacchè le variazioni che eventualmente potessero manifestarsi in queste diverse colture potrebbero essere di una diversa natura genetica.

g) *Dissociazioni di fasi diverse del ciclo vitale del microrganismo.* Ho già esposto più sopra la concezione di Leonian, relativa alla variabilità dei *Fusarium*, che ammette come causa di variazione l'esistenza di più fasi distinte nel ciclo vitale di una data specie, varietà o razza fungina, per analogia con quanto è stato trovato nei batteri. Ho anche esposto le ragioni per le quali io non credo che le variazioni brusche presentate dai funghi sieno attribuibili alla dissociazione di fasi *ciclogeniche* paragonabili a quelle dei batteri. È adunque esclusivamente a questi ultimi che ci si dovrebbe riferire

nella trattazione delle variazioni determinate da dissociazioni di fasi diverse dal ciclo vitale. Veramente le variazioni brusche, che nelle colture dei batteri si manifestano con l'apparire di uno o più settori nelle colonie, nella gran maggioranza dei casi non sono in relazione con l'estrinsecarsi e il successivo sviluppo di una di quelle fasi che sono state descritte da Löhnis e Smith sino dal 1916, ma tali variazioni dipendono più comunemente dall'acquisto o dalla perdita di un carattere morfologico secondario, con cui stanno in correlazione uno o più caratteri fisiologici.

L'arrestarsi dell'accrescimento di una data fase e lo svilupparsi in sua vece di un'altra è sempre in dipendenza di cambiamenti delle condizioni dell'ambiente. Hadley è di opinione che l'invecchiamento della coltura, modificazioni della reazione del mezzo, della temperatura, variazioni fisiche e chimiche delle sostanze nutritive, presenza o assenza di ossigeno, azione di sostanze tossiche, di secrezioni od escrezioni, prodotti del metabolismo e tante altre cause di arresto dell'accrescimento, costituiscono altrettanti fattori determinanti fenomeni dissociativi nei batteri, per cui una fase viene soppressa ed è sostituita da un'altra, resistente alle condizioni sfavorevoli a quella precedente. Queste diverse fasi del ciclo vitale del microrganismo, possono rimanere latenti, come proprietà potenziali, nel protoplasma e nella sostanza nucleare per mancanza dello stimolo appropriato, ma non appena le condizioni esterne raggiungono un certo grado di stimolazione, queste fasi insospette dell'organismo si estrinsecano. Tali variazioni possono durare per una, due o anche per alcune generazioni e ritornare poi allo stato latente se le condizioni del mezzo ritornano favorevoli all'accrescimento della fase che noi indichiamo come normale. Così dal simplasma i granuli di rigenerazione provvedono, nell'*Azotobacter,* per es., al ritorno della fase comunemente nota di questo batterio. È forse opportuno ricordare che Rosen nelle sue recenti ricerche sulla variabilità dei batteri ha riconosciuto che la fase, la quale si presenta al microscopio sotto forma di granuli minutissimi, e che come i gonidangi e relativi gonidi, gemme e simplasmi, segue a processi di autolisi, non può considerarsi come vitale con sicurezza, giacchè non è stato possibile di constatarne l'accrescimento e la moltiplicazione.

h) *Variazioni più o meno durevoli indotte da azione parassitaria.* In questa categoria di variazioni non possono esser comprese che quelle presentate dai batteri per effetto del batteriofago

di D'Herelle. Questo tipo di variazione del resto non differisce da quello della categoria precedente che nella causa di arresto dell'accrescimento di una fase. Per citare un sempio, la fase di bacillo è arrestata dal batteriofago nel bacillo di Shiga *(B. dysenteriae* Shiga), mentre la fase di cocco è resistente. Se in una coltura è presente il batteriofago avviene dunque l'arresto dell'accrescimento e la scomparsa della forma di bacillo e lo sviluppo di quella di cocco.

Evidentemente l'eventualità di una simile causa di variazione nelle colture dei batteri deve esser tenuta presente prima di ammetterne delle altre ad azione più incerta.

***

Queste che ho ora esaminato sommariamente sono le diverse interpretazioni della natura genetica delle variazioni che si presentano nelle colture monosporogenite o cloniali dei microrganismi. Come risulta da un simile esame, non si può considerare una causa unica per tutte le variazioni brusche osservate, per quanto nella maggior parte dei casi esse si presentino in modo pressochè eguale. Ciascuna delle interpretazioni ora riferite può trovare una giustificata applicazione ad alcune delle variazioni osservate dai diversi microbiologi.

Senza dubbio dobbiamo riconoscere che il maggior numero delle cosidette *saltations* o *mutazioni settoriali* delle colonie dei microrganismi è costituito da quelle variazioni che consistono nella segregazione repentina di stipiti differenti dalla forma originaria senza che la oro origine possa essere attribuita con sicurezza alla disgiunzione somatica di una forma eterozigota, o alla dissociazione di *mixschimere* o a mutazioni vegetative. Sieno queste variazioni non così profonde come le mutazioni vegetative, e sieno esse delle vere mutazioni vegetative, dobbiamo riconoscere che esse derivano da cambiamenti di fattori interni e che per esse si originano delle razze, delle forme, degli stipiti che sono dotati di caratteri più o meno divergenti da quelli della forma originaria da noi comunemente conosciuta.

La possibilità d'isolare questi varianti, di coltivarli per un numero indefinito di generazioni e di constatarne quindi la stabilità, almeno per molti di loro, ci ha indotto a considerarli come nuove razze, o nuove forme, alla cui origine per caso noi ci troviamo ad assistere. Alcune razze o forme, in tutto simili a quelle ottenute in coltura, erano già state trovate in natura, per cui può sorgere il dubbio che quei varianti, che noi consideriamo come nuovi, sieno tali

soltanto relativamente alle nostre limitate conoscenze delle svariatissime razze e forme che di una data specie esistono in natura. Ammesso che qualsiasi specie presenti un determinato limite di variabilità, può esser facilmente concepito come anche in natura, nell'infinito numero di condizioni in cui si sviluppano gl'individui di una data specie possano essersi verificate tutte le variazioni compatibili coi limiti di variabilità della specie stessa. Noi non possiamo certamente stabilire con facilità, come facciamo nelle colture artificiali, se nel micelio di un fungo che si sviluppa sopra un organo di una pianta siasi manifestata una variazione settoriale, ma dopo quanto è stato constatato nelle colture, dobbiamo ammettere senz'altro una tale possibilità. Senza dubbio le condizioni di nutrizione e di ambiente in cui i parassiti ed i saprofiti si trovano in natura non sono identiche a quelle realizzate nei laboratori scientifici, ma è ormai dimostrato del resto che le condizioni di nutrizione e d'ambiente hanno solo una influenza secondaria sopra l'originarsi delle variazioni più profonde e durevoli.

È lecito ora domandarsi se le specie esistenti abbiano ormai esaurito tutte le possibilità di variare, compatibili con la loro particolare potenzialità di variazione, e se noi assistiamo in laboratorio soltanto al replicarsi di variazioni già infinite volte avvenute in natura o se, per le condizioni artificiali da noi realizzate, sia stimolata l'estrinsecazione di varietà rimaste sino a quel momento allo stato latente e quindi non ancora esistenti in natura. Ma se anche quest'ultima eventualità si verificasse, il numero di simili variazioni *nuove* non potrebbe esser molto grande nè di un'apprezzabile importanza dal punto di vista della biologia della specie.

Il concetto che noi possiamo farci dell'andamento delle variazioni in una specie qualsiasi di microrganismo, in seguito alla scoperta delle variazioni brusche e alle osservazioni sulla loro origine, è quello di un'evoluzione delle diverse varietà, razze, forme, comprese entro l'orbita della specie stessa, non secondo una linea a zig-zag, come la concepisce Leonian, ma secondo un sistema di ramificazioni derivante da uno stipite unico.

La ramificazione più o meno ricca, e cioè, una maggiore o minore ricchezza di forme varianti diverse, conferisce alla specie una condizione di dominanza nella lotta contro la concorrenza di specie affini sia sistematicamente sia per esigenze biologiche.

Non c'è alcuna difficoltà a ritenere che ogni specie presenti nella sua variabilità un particolare sistema di linee evolutive dei singoli

varianti, un particolare sistema di ramificazioni, distinto per il numero e la divergenza dei singoli rami.

Non vi è niente di strano ad ammettere che coltivando dei microrganismi in coltura pura e derivata da un'unica cellula, noi assistiamo all'originarsi di una ramificazione che probabilmente si è già ripetuta e si ripeterà per un numero indefinito di volte. È ammissibile che vi sieno specie nelle quali questo sviluppo di varianti sia più attivo ed altre nelle quali sia meno attivo, o perchè si tratta di specie vecchie e prossime ad estinguersi o perchè sin dalla loro origine furono dotate di una limitata capacità di variare. Questa concezione della variabilità si riferisce naturalmente solo a quella forma di variazione spontanea, discontinua, non reversibile, che teoricamente si può ammettere che possa compiersi secondo una predestinata evoluzione della specie, delle varietà, delle razze (1), indipendentemente dalla variazione che deriva solo dall'impurità genetica.

Se è vero che le nuove nozioni acquistate intorno alla complessità di forme diverse che costituiscono una data specie, pongono in imbarazzo spesse volte il sistematico che segua ancora i rigidi schemi della vecchia tassonomia, è alquanto esagerato il pensare che la distinzione fra specie e specie basata sui caratteri morfologici non possa più essere utilizzata. Se questo è vero per i batteri, per le specie dei quali senza dubbio occorre conoscere con esattezza i limiti di variabilità in determinate condizioni colturali, per i funghi, anche per quelli più pleomorfi, sarà sempre relativamente facile stabilire il valore medio, per ciascuna specie, dei singoli caratteri diagnostici che si presentano sopra un dato substrato di composizione ben definita. Bisogna riflettere che la maggiore variabilità è stata trovata nelle forme imperfette dei funghi, molte delle quali appartengono, come fasi, al ciclo vitale di forme superiori. Dal punto di vista della sistematica quindi nei casi di forme conidiche molto variabili, potrà esser trovato un punto di riferimento più sicuro nello studio della corrispondente forma ascofora o basidiofora.

Da un punto di vista pratico le nuove nozioni sulla variabilità dei microrganismi, e specialmente dei funghi, fanno intravedere

(1) Una simile concezione investe certamente, come fa osservare Brierley, la questione del monofiletismo e del polifiletismo della specie. Ma quando si consideri il monofiletismo secondo un concetto *preformista*, quando cioè si ammetta che nello stipite originario sieno già contenute allo stato potenziale tutte le possibili variazioni spontanee che nella sua evoluzione può presentare la specie. Il monofiletismo così concepito non può trovarsi in contrasto con le dottrine evoluzioniste ispirate anche al più puro vitalismo.

un'eventuale applicazione utile dell'esatta conoscenza dell'azione delle condizioni di nutrizione nel provocare le variazioni. Si è visto che in generale in seguito a queste la virulenza delle forme patogene tende a diminuire o a scomparire. Ci si può proporre il quesito se un simile fatto non potrebbe essere utilizzato, in Fitopatologia, per combattere determinate malattie di natura parassitaria. Attualmente la Genetica applicata alle piante superiori cerca di fornire all'agricoltore piante resistenti a determinati parassiti, ma in molti casi difficoltà d'indole tecnica e anche commerciali si oppongono a una simile soluzione del problema.

Perchè non dovrebbe la Genetica, applicata ai microrganismi patogeni, provocare o accelerare una variazione di questi ultimi nelle piante stesse infette?

Senza dubbio in natura l'esaltamento o la diminuzione della virulenza di un parassita, la comparsa o la scomparsa di malattie epidemiche sono spesso riferibili a variazioni subite dall'agente patogeno stesso.

Potrà essere in nostro potere di realizzare quelle stesse condizioni che agiscono in natura o altre equivalenti? Io ritengo che quando le nostre nozioni sopra le leggi che regolano la variabilità dei microrganismi saranno molto più progredite di quanto lo siano attualmente, un simile problema potrà esser risolto con successo.

Ma anche se questa fortunata applicazione a cui ora ho accennato si rivelasse una semplice utopia (1), non cesserebbe per questo tutta l'importanza che noi dobbiamo attribuire alle ricerche sulla variabilità dei microrganismi. È questa la nuova via da additarsi alla fervida operosità e all'entusiasmo pieno di fede di coloro che si dedicano agli studi di Microbiologia (applausi).

---

(1) In contrapposto a queste mie illazioni ottimistiche si devono ricordare le idee espresse da Leonian relativamente al significato biologico delle variazioni nei microrganismi parassiti. Egli, considerando i fatti posti in luce principalmente dai batteriologi, che le dissociazioni di fasi diverse del ciclo vitale dell'organismo rendono a questo possibile di resistere a fattori esterni sfavorevoli o nocivi, pensa che sia logico ammettere che simili variazioni possono render capace un parassita di vincere la resistenza dell'ospite o d'impedirgli di reagire, tanto più che in generale la lotta fra microrganismo patogeno e cellule dell'ospite si esplica con mezzi chimici, come condizioni chimiche stimolano le variazioni nelle colture. Tutto questo è senza dubbio ben ammissibile, ma si deve riflettere che se una variazione in un dato senso può essere provocata dall'organismo ospite in determinate condizioni di esistenza, non c'è ragione di escludere che variazioni in altro senso possano essere egualmente provocate in condizioni diverse.

Il *Presidente* invita il Prof. Curzi a svolgere la propria comunicazione:

Su la mutazione di un ifomicete (*Fusarium moronei*)

Prof. Curzi: In questi ultimi anni, mentre molti studi sono venuti a provare l'esistenza della sessualità nei funghi, molti altri ci hanno fatto conoscere la presenza di variazioni brusche ereditarie tanto nei funghi quanto nei bacteri.

Queste ultime da molti autori sono state chiamate « saltation » da altri « dissociazioni » e da altri ancora « mutazioni ». L'ultima denominazione è certamente quella più giusta e quella che più si adatta a indicare le variazioni delle specie microbiche quando esse non sono semplici modificazioni fenotipiche dipendenti più che altro dal substrato culturale, o la somma di graduali e progressive variazioni limitatamente ereditarie per via vegetativa ottenute per favorire, con condizioni ambientali appropriate, lo sviluppo di una data forma vegetativa o fruttifera (Arricchimento di Schwarz) (1), ma sono modificazioni profonde comparse improvvisamente e che poi si perpetuano nelle successive generazioni.

Le mutazioni nei funghi e nei bacteri sono quasi sempre modificazioni di ife o di cellule vegetative durante lo sviluppo di una specie e sono rivelate dalla comparsa di settori nelle colonie con caratteristiche diverse da quelle dello stipite materno. Tali settori rappresentano nuovi tipi di accrescimento e quindi nuove forme di sviluppo che si sono segregate dallo stipite originario. Essi stanno ad indicare perciò delle mutazioni vegetative che si manifestano generalmente con la perdita di uno o più caratteri, come diminuzione o scomparsa del micelio aereo, di organi di conservazione e di riproduzione, di pigmentazione, di virulenza, ecc.

I settori comparsi nelle colonie dei funghi e dei bacteri, isolati e coltivati separatamente si conservano distinti dalle colonie originali, ma non sempre la differenziazione persiste nei successivi trapianti. Spesso si osserva il ritorno dello stipite isolato nello stipite materno, e su queste reversioni alcuni autori hanno basato l'opinione dell'instabilità delle mutazioni vegetative nelle specie microbiche e del ritorno del mutante allo stipite originale, in modo

(1) Schwarz: *Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Gattungen Aspergillus und Penicillium* — « Flora »; Bd. 123, Heft. 4, pp. 386-440, fig. 1928.

che si avrebbe un'oscillazione di caratteri attorno ad un tipo medio in una data orbita specifica sostenuta dall'Hadley (1) nei bacteri e dal Leonian (2) nei Fusarium.

Altri autori fanno osservare invece che se non tutte le forme ottenute per variazione settoriale, molte rimangono stabili, resistono ai vari eccitanti chimici e fisici e non manifestano alcun ritorno al tipo originale.

Per gli uni i settori non rappresentano che delle fluttuazioni inabili ad originare stipiti e razze nuove per la limitata variazione dei caratteri attorno ad un tipo medio a seconda delle condizioni che possono far esaltare una fase piuttosto che un'altra, per gli altri invece i settori rappresentano vere mutazioni, attraverso le quali è possibile avere razze nuove o piccole specie esistenti in natura sugli stessi ospiti o su ospiti diversi, le quali si conservano tali dopo essere passate attraverso agli animali o alle piante parassitizzate e dopo essere state coltivate per numerose generazioni in substrati assai vari.

***

Dalla stabilità degli stipiti comparsi e isolati da un dato stipite originario dipende evidentemente tutta l'importanza scientifica e pratica di queste speciali mutazioni. E per questo mi son proposto di indagare, con una serie di ricerche che intendo eseguire in questa Stazione sotto la direzione del Prof. Lionello Petri, il quale ha messo a mia disposizione ogni mezzo d'indagine, se è possibile ottenere da una colonia monosporogenita di un dato stipite fungino stipiti differenti, non reversibili, e di ricercare attraverso alla modificazione di ogni singolo carattere l'entità della deviazione ed i rapporti biologici e tassonomici fra stipiti materni e mutanti.

Le prime ricerche sono state fatte sul *Fusarium Moronei* Curzi (3) dopo un dettagliato studio morfologico e fisiologico della specie; esse si possono riassumere come segue:

---

(1) Hadley P.: *Microbic dissociations* — « Journal Inf. Dis »; v. 40, pp. 1-312, 1927.

(2) Leonian L. H.: *Studies on the variability and dissociation in the genus* — « Fusarium-Phytopathology »; v. 19, n. 9, pp. 753-868, Pl. XVI-XXXIII, 1929.

(3) Curzi M.: *Intorno alla posizione sistematica di un* « Fusarium » *isolato dalla pelle del cane* — « Atti Ist. Bot. R. Università Pavia »; ser. IV, vol. I, pp. 95-105, fig. 2, 1929.

Dalle colture monosporogenite di *Fusarium Moronei* si possono avere settori di variazione e separare diversi stipiti del fungo che differiscono dall'originale per l'aumento o la diminuzione del micelio aereo, per la presenza o assenza di sclerozi o di determinate forme di sporificazione e di clamidospore.

La composizione e la concentrazione dei principi nutritivi del substrato hanno una sensibile influenza sulle variazioni settoriali delle colture.

I settori sono più frequenti nei terreni ricchi che in quelli poveri, ma non però in quelli poverissimi; nell'agar semplice con soluzioni saline e con soltanto traccie di glucosio e di asparagina essi compaiono pure con una certa frequenza.

I caratteri presentati dagli stipiti derivati dai settori rimangono pressochè costanti eccetto leggere fluttuazioni nello sviluppo del micelio.

Gli stipiti isolati originano a loro volta dei settori secondari, i quali se nella maggioranza tendono a dare stipiti a caratteri intermedi, alcuni ripetevano i caratteri dello stipite originario per cui non sono mancate le reversioni, che però sono sempre avvenute per nuove variazioni brusche nell'accrescimento delle ife in senso opposto alla variazione precedente.

Alcuni stipiti non reversibili sono stati ottenuti sottoponendo i trapianti dei settori di una coltura monoconidica ad una opportuna selezione. Due di questi stipiti (α e γ) si sono avuti scegliendo su numerose piastre e per diverse generazioni, per l'uno (α) il settore con micelio aereo più abbondante per l'altro (γ) il settore con il micelio aereo più povero.

Lo studio comparativo di questi due stipiti ha portato a rilevare differenze sostanziali sia nei caratteri colturali come in quelli morfologici e fisiologici. Così mentre lo stipite α ha abbondante micelio aereo e la fruttificazione sporodochiale, lo stipite γ invece ha poco o nulla micelio aereo e non sporifica che per pseudopionoti, inoltre mentre il primo ha sclerozi, clamidospore colorate, echinulate ed aggrappate in numerosi e vari botrioni, il secondo non ha che clamidospore intercalari sempre ialine e liscie.

Quando i due stipiti vengono a svilupparsi in opposizione sulle medesime piastre si manifesta un marcato antagonismo con la formazione nella linea d'incontro delle due colonie, di una linea scura, di ife ramificate e contorte anormalmente, di micelio aereo e di spo-

roficazioni più abbondanti. Tale antagonismo, che secondo alcuni autori esisterebbe soltanto fra specie differenti e non fra stipiti della medesima specie, è quasi nullo nei terreni poveri, mentre è forte in quelli ricchi ben forniti specialmente di principi idrocarbonati.

La posizione sistematica dei due stipiti nel più moderno quadro analitico del genere *Fusarium* elaborato nel 1925 da Wollenweber, Sherbakoff ed altri specialisti (1) è nettamente diversa sebbene non esorbiti i limiti della sezione *Gibbosum* Wr. Lo stipite α conserva la posizione della specie nella sottosezione *Ferruginosum*, mentre invece lo stipite γ rientra nella sottosezione *Eugibbosum* ed è vicinissimo al *Fusarium falcatum* App. et Wr. col quale si confonde (applausi).

Il *Presidente* invita la Prof.ssa E. Morelli a svolgere la propria comunicazione:

Osservazioni sul polimorfismo delle streptotrichee.

Prof.ssa Morelli: Dai focolai actinomicotici caratterizzati dall'esistenza di filamenti intrecciati e terminati con i caratteristici rigonfiamenti a clava sono stati isolati germi apparentemente assai diversi, classificati comunemente come appartenenti ai generi Nocardia e Cohnistreptothriz. Lingnères e Spitz hanno inoltre descritto nei bovini una forma morbosa analoga all'actinomicosi determinata da un tipico schizomiceta: l'actinobacillo. I germi appartenenti al genere Nocardia aerobi assoluti o facoltativi vegetano anche allo stato saprofitico sotto forma di filamenti miceliali ramificati capaci, secondo alcuni autori, di frammentarsi in spore ben individualizzate e da alcuni avvicinati per questi loro caratteri agli ifomiceti. Le Cohnistreptothrix sono organismi anaerobi e non si distinguono dai batteri per alcuni dei loro caratteri; dovrebbero quindi esser classificati fra i bacilli capaci di ramificarsi accanto al b. difterico e al tubercolare. L'actino-bacillo è un cocco-bacillo gram negativo. Lignères e Spitz hanno proposto di designare sotto il nome generico di *actinofiti* tutti gli organismi capaci di dare nei focolai morbosi il tipo di vegetazione actinomicotico.

Sul significato etiologico, per altro, di questi microrganismi

(1) Wollenweber H.W., Sherbakoff C. D., Reinking O. A., Johann H. and Bailey A.: *Fundamentals for Taxoiomic Studies of Fusarium* — « Journ. Agricol. Res. »; v. XXX, n. 9, pp. 835-843, fig. 1, 1925.

verte ancora la discussione, ritenendo alcuni tutte queste forme responsabili della malattia, supponendo altri che solo una rappresenti il vero agente causale mentre le altre forme dovrebbero ritenersi come virus occasionali.

Ho avuto precedentemente occasione di riferire modificazioni osservate in un ceppo di Streptothrix carnea, isolata dal Prof. Silvio Dessy, in Argentina, in un caso di streptotricosi polmonare (1).

Questa forma strettamente aerobia subito dopo l'isolamento poteva, in seguito a lunga permanenza su agar comune, adattarsi gradatamente alla vita anaerobia, cambiando completamente l'aspetto culturale, morfologico e l'affinità verso i comuni coloranti usati nella tecnica batteriologica. Ne conclusi per la perfetta identità fra le specie aerobia e anaerobia ciò che depone per l'inutilità di ogni classificazione di un gruppo di microorganismi così spiccatamente polimorfi da potere assumere tutti i caratteri considerati come specifici dei diversi generi descritti.

Poichè si è ritornati anche recentemente sia sul concetto di classificazione (Redaelli) (2) sia sulla distinzione delle varie specie (Puntoni) (3) ho ripreso in più attento esame le modificazioni morfologiche culturali e biochimiche che il germe da me studiato assume nel passare dalla vita aerobia alla anaerobia, potendo giungere a conclusioni che mi sembrano un non trascurabile contributo allo studio della biologia di questi germi, e una conferma precisa all'ipotesi che in quella prima nota ebbi ad accennare, essere cioè tutte e tre le forme, apparentemente così diverse, isolate dai focolai actinomicotici, stadi di sviluppo diversi di un germe dotato di straordinaria variabilità.

Nello studio delle modificazioni morfologiche cui andava incontro il ceppo di streptotrichea da me preso in esame osservai subito una prima caratteristica: il germe diveniva scarsamente colorabile con tutti i comuni colori di anilina usati comunemente nella tecnica batteriologica, tantochè per metterli in evidenza ero dovuto ricorrere alle immagini negative quali appaiono nelle preparazioni alla Burri, ma ciò mi rendeva difficile lo studio dei dettagli strutturali e poteva indurmi in facile errore, molto più che le modificazioni osservate si ottenevano quasi sempre in ambiente liquido, e la pre-

(1) « Lo Sperimentale », 1928.
(2) « Boll. S.S.R. », 1929.
(3) « C. R. Soc. Biol. », 1930.

senza di traccie del terreno rendeva meno precisa la preparazione. Ottimi resultati ho ottenuto più recentemente colorando col metodo May-Grünwald-Giemsa, poichè prolungando alquanto il tempo della colorazione ottenevo preparazioni assai precise e potevo altresì mettere in evidenza alcune particolarità che nel precedente lavoro mi erano sfuggite. Potei così confrontare esattamente le modificazioni dei caratteri morfologici presentati dal germe durante il passaggio dalla vita aerobia alla anaerobia con le alterazioni dei caratteri culturali e delle proprietà fermentative.

Da prima adattavo il ceppo in esame alla vita anaerobia seminandolo in brodo e facendo il vuoto mediante una pompa e, dopo diversi passaggi, quando il germe sembrava essersi adattato a questo nuovo genere di vita, seminavo in un terreno liquido contenente sostanze riducenti, la cui azione veniva a sommarsi con l'aspirazione dell'ossigeno fatta dalla pompa. In un secondo tempo mi accorsi come, aggiungendo sangue al terreno culturale, si ottenesse molto più rapidamente la trasformazione del germe.

Già dopo un primo trapianto in brodo sangue, come dopo diversi trapianti in brodo con aspirazione dell'ossigeno atmosferico, la streptotrichea invece di vegetare sotto forma di grosse colonie, le quali formano alla superficie del terreno una pellicola spessa, si sviluppa sotto forma di fiocchi minuti che si depositano al fondo. L'esame microscopico mostra che i lunghi filamenti, caratteristici di queste specie, intrecciati ancora fittamente al centro, alla periferia si presentano discontinui e fra loro appaiono spazi chiari, debolmente acidofili che separano corti bastoncelli o granuli rotondeggianti, i quali possono apparire anche liberi nel campo microscopico.

Nei successivi passaggi il liquido culturale acquista un aspetto pulverulento e l'esame microscopico ci mostra il disfacimento del fitto intreccio costituito dai filamenti miceliali i quali si avvolgono in una matassa a maglie più larghe; inoltre, mentre prima l'insieme di questi filamenti si colorava uniformemente, adesso compare fra loro una sostanza che col metodo May-Grünwald-Giemsa viene colorita in rosa, mentre i filamenti sono ancora coloriti in azzurro. Questi del resto, non sono uniformemente colorati, ma presentano in molti punti quei caratteri di discontinuità che nei precedenti trapianti erano visibili solo alla periferia della colonia. La formazione di corti bastoncelli, già osservata da tutti i ricercatori che si sono precedentemente occupati dell'argomento, era stata fino ad ora interpretata come sporificazione. Nè riuscirebbe difficile comprendere come

un germe aerobio costretto a vivere in un terreno povero di ossigeno desse luogo alla formazione di spore, mentre le forme vegetative vengono perdute. Ma in questo caso dovremmo logicamente aspettarci di non vedere ulteriormente modificate le predette formazioni, finchè durano le condizioni sfavorevoli che hanno determinato la sporificazione, mentre, quando tali condizioni cessassero, dovremmo assistere al germogliamento delle spore. Ciò invece non si verifica; continuando a seminare in un terreno povero, ma non privo di ossigeno vediamo ancora uno sviluppo rigoglioso di questo microrganismo sotto il nuovo aspetto granulare, o più spesso sotto forma di bastoncelli allungati riuniti a gruppetti di tre o quattro, con qualche ramificazione laterale. Se invece innestiamo la cultura in terreni assolutamente privi di ossigeno questi non vengono intorbidati, nè si formano depositi al fondo; sembrerebbe che lo sviluppo si fosse arrestato se non se ne avvertisse la presenza per la pronta acidificazione del terreno nutritizio e la rapida emolisi determinata nel brodo sangue. L'esame microscopico ci rivela in questo caso la presenza di scarsi bacilli, isolati, allungati, non ramificati molto simili al bacillo difterico, presentano infatti nell'interno la caratteristica presenza di granuli polari. Possono osservarsi inoltre forme coccacee irregolari per forma e grandezza e disposte in corte catenelle di quattro o cinque elementi. Dopo un numero vario di passaggi, durante i quali il ceppo in esame continua a vivere e vegetare sotto questo nuovo aspetto, bruscamente può presentare uno sviluppo più rapido e abbondante, allora vediamo depositarsi al fondo della provetta masserelle fioccose di consistenza mucillaginosa. Al microscopio osserviamo le stesse formazioni coccacee precedentemente descritte, raccolte in catene lunghissime. La lunghezza veramente sproporzionata delle culture, lo spiccato polimorfismo di questi germi talora coccobacillari, tal'altra rigonfiati ad un'estremità a clava distinguono queste formazioni dai tipici streptococchi. Trapianti alternati in brodo sangue e brodo fegato facilitano questa ultima trasformazione.

Allestendo con queste culture piastre di agar fegato alla Fasiani-Zironi nascono colonie piccolissime a margini frastagliate corrispondenti a quelle caratteristiche dell'actinomices farcinicus. Seminando invece su agar comune, ordinariamente il germe non si sviluppa che debolmente nell'acqua di condensazione, una sola volta, dopo molti giorni, ho visto comparire una colonia prima biancastra opaca, la quale più tardi ha mostrato la caratteristica formazione di

anelli concentrici ricoperti da filamenti aerei bianchi pulverulenti proprio come avviene nelle colonie su agar delle streptotrichee. Peraltro, nessun carattere di rassomiglianza ho potuto osservare in questo ceppo, ricostituitosi verosimilmente dalle forme anaerobie, rispetto al ceppo aerobio originario, non il colorito delle colonie, qui bianco, là roseo, non l'epoca della formazione dei filamenti aerei, qui tardivo là precoce, non il volume delle colonie, qui grosse là piccolissime.

L'esame delle brodoculture in aerobiosi del germe così trasformato ci dà delle immagini assai convincenti. Qui assistiamo infatti a tutte le varie fasi di ricostruzione della complessa colonia streptotrichea. Tra le forme coccacee disposte in catene lunghissime cominciano a comparire masse acidofile che formano come la trama intorno a cui tali catene di microrganismi si orientano variamente incrociandosi. Più tardi esse formano un intreccio assai stretto, gli elementi si allungano si fondono ricostituendo il filamento miceliale. Parallele a queste modificazioni dei caratteri morfologici e culturali sono quelle delle proprietà fermentative. Il ceppo originario non acidifica il terreno e non fermenta gli zuccheri e neppure i ceppi modificati riportati in aerobiosi. Al contrario ai primi passaggi in ambiente povero di ossigeno cominciamo ad osservare la fermentazione dei monosaccaridi. Inoltre quando il germe si è poi assuefatto alla vita anaerobia, fermenta, con sviluppo di gas, anche i disaccaridi. Il sangue non viene emolizzato, finchè vien conservato il caratteristico aspetto delle colonie streptotrichee, quando comincia la frammentazione dei filamenti si inizia invece una lieve emolisi. I ceppi anaerobi emolizzano rapidamente. Quando si ricostituisce la forma aerobia sovente l'emoglobina viene trasformata in un leuco derivato.

Ho provato a ripetere le prove in un ceppo di Streptothrix alba Vulgaris della nostra collezione. Questa si mostrava molto refrattaria alla limitazione di ossigeno, finchè coltivata in brodo, ma l'aggiunta di sangue al terreno determinò modificazioni analoghe a quelle sopra riportate.

Da quanto sopra ho esposto risulta chiaramente come uno stesso ceppo di Streptotrichea possa attraversare tutti gli stadi dati per caratteristici delle varie specie. Una simbiosi di due specie distinte era qui da escludersi per varie ragioni che ometto per brevità, e sopratutto perchè ho potuto cogliere tutti i graduali passaggi dall'uno all'altro tipo morfologico.

Un altro rilievo mi sembra farsi riguardo alla formazione di granuli coccoidi e di elementi bacillari comunemente ritenuti come spore. L'aver osservato come esse siano capaci di vita indipendente mi fa pensare che si tratti anche in questo caso di forme vegetative, probabilmente avviene qui qualche cosa di analogo a quanto si riscontra in certi blastomiceti, i quali, a seconda del terreno culturale, possono dar luogo a formazioni separate ovvero vegetare come filamenti miceliali. Nel caso specifico penso che in un terreno più ricco di ossigeno queste forme possono elaborare una sostanza cementante che unisce fra loro i vari elementi. Tale significato mi sembra possa darsi appunto alle masse acidofile che comparivano nelle culture e intorno a cui si orientavano le forme Streptococciche a ricostituire le forme ramificate.

Ma un'altra conclusione di indole biologico generale sembrami potersi trarre dalle osservazioni suesposte. È noto come germi i quali ordinariamente appaiono sotto forma bacillare possono presentare talora delle ramificazioni vere; tale è il caso della tubercolosi, della morva e della difterite. Per ciò che concerne la lebbra esistono perfino reperti culturali, peraltro non da tutti confermati, in cui si è isolata dai lepromi germi analoghi alle streptotrichee. Ordinariamente la presenza di ramificazioni si accompagna anzi ad una diminuita virulenza.

Alcuni di questi germi, come la tubercolosi possono, come tutti sanno, mostrare anche formazioni granulari le quali, secondo alcuni, starebbero a rappresentare uno stadio particolare di sviluppo, forse filtrabile del virus. Nelle mie esperienze ho potuto osservare che un medesimo ceppo di streptotrichea poteva vegetare sia sottoforma di lunghi filamenti ramificati, sia sotto forma granulare o bacillare, e l'aggiunta di sangue al terreno lo rendeva particolarmente adatto allo sviluppo di queste ultime forme; sappiamo d'altronde come dai focolai actinomicotici chiusi si isolino più facilmente le forme a corti filamenti anaerobie dai focolai aperti quelle a lunghi filamenti, assai diffuse del resto in natura allo stato saprofitico. Ciò mi sembra autorizzare l'ipotesi che le Streptotrichee, rappresentino le forme basali dotate di notevole polimorfismo da cui si sono differenziati, per graduale adattamento alla vita parassitica, gli altri germi appartenenti ai gruppi dei Micobatteri, dei Corinbatteri e le altre formazioni Cohnistreptothrix e Actinobacillo riscontrate nei focolai actinomicotici (applausi).

Discussione.

Prof. ZIRONI, fa notare l'analogia fra le interessanti osservazioni della Professoressa Morelli sulle modificazioni del fungo dell'actinomicosi e quelle del bacillo della lebbra da lui precedentemente descritte.

Ambedue i microorganismi presentano una forma parassitica ed una o più forme saprofitiche; queste ultime possono essere diverse fra di loro: ambedue hanno uno stadio di vita anaerobico o micro-aerobico ed uno aerobico: ambedue una forma bacillare ed una forma filamentosa e ramificata.

Il bacillo della tubercolosi, come risulta dalle interessanti osservazioni del Prof. Sanfelice, si comporta nello stesso modo.

Questi fatti tratti dallo studio di pochi microorganismi sono forse esempi molto spiccati di modificazioni presentate dai germi in genere, nelle stesse condizioni sperimentali, e meritano grande attenzione per lo studio del pro blema della patogenicità dei germi e delle sue cause.

Prof. MONTI. – La dotta Relazione generale del Petri, le belle ricerche del Curzi sopra una specie nuova di Fusarium, la comunicazione riccamente illustrata della Morelli hanno tra loro un legame che ne accresce l'importanza, in quanto tutte insieme prospettano il problema generale della specie in micologia, quale deve essere inteso allo stato presente della scienza. Gli studi della Morelli illustrano e documentano l'estensione della variabilità nel gruppo degli actinomiceti e ci fanno intendere come forme diverse, che in base al solo criterio morfologico potrebbero considerarsi come specie sistematiche, debbono invece rientrare in una stessa specie biologica, capace di assumere forme diverse a seconda dell'ambiente nel quale si sviluppa. Dallo svolgimento di questi studi potremo giungere a meglio conoscere i limiti della variabilità ed a meglio definire quale è la forma più completa che può raggiungere una specie nell'ambiente più adatto. Potremo così derivare nuovi criteri di classificazione.

La relazione sintetica del Petri e le osservazioni del Curzi mirano ad interpretare la natura genetica delle variazioni saltuarie, che si possono manifestare in uno stesso ambiente, in una stessa coltura. L'analisi minuta di queste variazioni ha sviluppato il campo della genetica: infatti la dimostrata sessualità dei miceti anche inferiori invita a spiegare talune variazioni in base alle leggi mendeliane, ma l'esistenza di specie multipolari con diversi tipi di spore, sulle quali insisteva oggi il Curzi, rendono assai più difficile l'applicazione del mendelismo alla genetica fungina. D'altra parte la comparsa di stipiti divergenti, dotati di caratteri stabili, non più reversibili, fa pensare a *vere mutazioni*. A mio avviso con ciò non siamo ancora sicuri di assistere alla genesi di nuove specie, ma acquistiamo una chiara conoscenza di fenomeni biologici che hanno grande importanza non soltanto per la micologia generale, ma anche per la patologia parassitaria.

Le osservazioni e le idee generali, che abbiamo udito esporre, documentano tutta l'importanza del problema della specie per la biologia normale e patologica e ci danno un buon punto di partenza onde proseguire le indagini sulla variabilità dei microrganismi.

Prof.ssa Morelli E. – Ringrazioil Prof. Zironi per la sua interessante osservazione. Avevo presenti le sue ricerche sulla lebbra e appunto mi sembra che tanto la possibilità da lui dimostrata che un germe il quale nei tessuti ha l'aspetto di un comune schizomiceta, possa assumere in coltura le apparenze di una Streptotrichea, quanto le osservazioni innumerevoli di forme ramificate nelle vecchie culture di numerose forme schizomicetiche, depongono per la stretta parentela degli schizomiceti con le streptotrichee. L'osservazione da me fatta che l'aggiunta di sangue al terreno facilita la trasformazione di una streptotrichea a lunghi filamenti ramificati in una forma con apparenze schizomicetiche, mi sembra rendere verosimile l'ipotesi che gli schizomiceti siano il risultato di un adattamento alla vita parassitica di forme streptotricotiche saprofitiche a lunghi filamenti.

Al Prof. Monti devo rispondere che io non posso nel mio caso parlare di mutazioni nel senso del De Vries, perchè esse furono lente, graduali e mi fu possibile ritornare alla forma originaria, debbo perciò parlare di variazioni conseguenti ad un adattamento ambientale. Ho però notato che il ritorno al ceppo originario aerobio è tanto più difficile quanto più lunga fu la permanenza del germe in esame in anaerobiosi; spero pertanto con ulteriori ricerche di poter ottenere la fissazione di simili variazioni.

Il *Presidente* prega il Dott. U. Boncinelli di svolgere la sua comunicazione:

Sull'acquisto di caratteri propri del paratifo B da parte del bacillo tifico.

Dott. U. Boncinelli: Nella storia della batteriologia, al primo periodo che segue la sua nascita con Pasteur e con Koch e che aveva per dogma la fissità delle specie microbiche, s'è contrapposto quello moderno in cui riprendendo e sviluppando una idea che a poco a poco si faceva strada anche in tempi non del tutto recenti, questo concetto di invariabilità della specie viene a dimostrarsi non vero, o per lo meno a modificarsi alla luce delle osservazioni che ogni giorno si vanno moltiplicando. Questo argomento è di così grande interesse che ogni studioso di microbiologia è costantemente preoccupato di cogliere nelle sue manifestazioni e nel suo significato il fenomeno indiscusso della mutabilità dei germi.

Studiando certi batteri di un gruppo in modo particolare istruttivo a questo riguardo, per la tendenza alle variazioni, il cosidetto gruppo Tifo-Coli, io ebbi modo di osservare alcuni fatti non privi di interesse dal punto di vista scientifico ed anche perchè possono lumeggiare o confermare ipotesi fino ad ora rimaste come tali.

Si tratta di due esempi di trasformazione batterica. E per non pregiudicare il significato della parola trasformazione, che in ogni modo io adopero nel senso suo più comune, potrei dire trattarsi di due esempi in cui certi germi perdono alcune loro qualità distintive e ne acquistano altre tali da non essere più riconoscibili dal ceppo di origine.

Questi fatti sono stati osservati in 2 stipiti di bacillo di Eberth. In uno la modificazione fu osservata in condizioni sperimentali particolari, pur non potendo dire quale parte avessero nel provocare il fenomeno; nel secondo ciò avvenne in modo apparentemente spontaneo in culture conservate su agar come tutte le altre della collezione del nostro Istituto.

Il primo di questi ceppi — Tifo I — era sottoposto da vario tempo alla coltivazione ripetura in brodo. Debbo dire subito che questo mezzo mi parve altra volta, per riflessioni che non riferisco, particolarmente adatto a favorire la tendenza che certi germi hanno, anche in modo spontaneo, a variare qualche loro carattere. Così con questo mezzo ottenni sempre da parte di Brucella Melitensis l'acquisto di quei caratteri l'insieme dei quali prima valeva ad indicare i cosidetti paramelitensi, oggi considerati come una varietà. Allora con i Brucella, in seguito coi bacilli del tifo, usavo questo procedimento semplicissimo: brodoculture di vari stipiti venivano abbandonate in termostato per 7-8 giorni, tempo sufficiente per la formazione di un deposito al fondo della provetta; dopo di che col sedimento trapiantavo nuove brodoculture, e a queste facevo subire alla loro volta la stessa sorte delle prime.

I miei stipiti di Tifo (4 in una prima esperienza 5 in una seconda) così sottoposti all'invecchiamento nelle brodoculture, presentarono ai primi trapianti qualche variazione nella loro agglutinabilità; ma ciò non ha ora che poco interesse. Invece mi preme seguire più attentamente il comportamento del ceppo che ho già menzionato — T. I — appunto quello che subì le modificazioni che sto per riferire.

Tifo I è un tipico bacillo di Eberth e di questo mi ero reso conto prima di cominciare le esperienze. Si lascia bene agglutinare da un siero specifico, non è sensibile ad altri sieri preparati con germi affini,

se non quanto lo consenta la reazione di gruppo, non sviluppa gas nei terreni zuccherati, non riduce certe sostanze coloranti, non coagula il latte, non produce indolo. Viene mantenuto da varii anni nella collezione del nostro Istituto e sempre fu trovato tipico; nè mancherò di ricordare che la sua tipicità era già stata controllata anni or sono dal Prof. Lusena, mentre eseguiva alcune esperienze con questi germi, nell'Istituto di Patologia Generale di Firenze. Rimettendolo in esperimento oggi, ripeto che non ho riscontrato nessun cambiamento in questo stipite.

Il modo di comportarsi di T. I nel corso delle sedimentazioni fu da me seguito con attenzione insieme ad altri ceppi, e può essere in breve così riassunto:

Nessun cambiamento apprezzabile fino al 14° passaggio, eccetto una lieve iperagglutinabilità di fronte al siero specifico. Al 15° passaggio minore agglutinabilità da siero antitifico; al 16° siero-resistenza completa anche di fronte a un siero del titolo 1:25.000.

L'acquisto della sieroresistenza è un fatto assai comune e non mi meravigliava. Può essere ottenuto fra i tanti mezzi, col trattamento ripetuto con sieri immuni. D'altra parte stipiti inagglutinabili si riscontrano in natura. Ma a questo punto mi interessava conoscere in particolar modo il comportamento del mio stipite di fronte ad altri sieri del medesimo gruppo. Presi in considerazione T. I^{16} e il medesimo ceppo dopo altri sei trapianti dal sedimento, cioè T. I^{22} sempre avendo cura di paragonare volta per volta i risultati con altri ceppi di tifo sicuramente tipici, e con T. I originale.

I risultati, dopo il controllo di numerose prove, furono questi:

Morfologia. — Nessuna differenza fra T. I^{16} e ^{22} e T. I se non una maggiore irregolarità nella forma dei primi, con tendenza alla colorabilità più accentuata dei poli, ciò che fu descritto per il b. paratifico B immediatamente isolato dall'organismo.

Caratteri culturali.

Agar comune (per strisciamento). — Patine di T. I^{16} e T. I^{22} come tipici bacilli di Eberth, qualche volta più spesse, ciò che si riscontra non di rado nel paratifo B.

Brodo comune. — I ceppi sedimentati danno intorbidamento più manifesto; frequente formazione di pellicola alla superficie (altro carattere più facilmente riscontrabile in ceppi di paratifo B).

Agar glucosato al rosso neutro. — Frattura, scoloramento fluorescenza nei ceppi sedimentati. T. I lascia immodificato.

Liquido di Petruscky. — T. I^{16} e T. I^{22}: arrossamento al 1° giorno; al secondo il terreno assume un colore bleu permanente. T. I dà arrossamento lieve permanente.

Barsiekow al glucosio. — Stipiti sedimentati: arrossamento e coagulazione entro 24 ore. T. I arrossamento al 1°-2° giorno, coagulazione al 3°.

Agar Drigalsky-Conradi. — Colonie azzurre.

Latte. — Non coaugulato dopo 25 giorni; i ceppi sedimentati chiarificano leggermente il terreno dopo una ventina di giorni.

Brodo zuccherato. — Con glucosio, maltosio, saccarosio, levulosio, destrina, galattosio, in proporzione dell' 1 %. T. I^{16} e T. I^{22} produssero sempre gas con questi zuccheri, mai in ceppo T. I.

Proprietà antigeni. — Un siero agglutinante antipara B agglutina T. I^{16} e T. I^{22} come i controlli. Un siero preparato vaccinando un coniglio con T. I^{22} agglutina questo stipite fino a 1: 6400 e pressochè alla stessa diluizione i bacilli paratifici B della collezione T. I non è affatto influenzato da questo siero.

Tutti i caratteri acquisiti dal mio stipite di tipo mediante la sedimentazione, sembrano essere stabili, non avendo modificazione alcuna nel periodo di oltre un anno, in cui vengono conservati su agar comune.

***

La seconda osservazione si riferisce a un ceppo di tifo (T. Venezia) che faceva parte del gruppo di germi sottoposti alla sedimentazione. Ma poichè di ciascuno stipite messo in esperienza, dovevo controllare prima la tipicità, fu nell'occasione di questo saggio che mi accorsi della scarsa sensibilità di T. Venezia (per abbreviazione T. V.) di fronte al siero agglutinante specifico. Ho dei protocolli dell'ottobre 1928 in cui si legge che un siero antitifo del titolo 1: 6400 agglutina T. V. solo fino a 1: 100. Un siero antipara B (titolo 1: 2000) agglutinava lo stesso ceppo fino a 1: 200, ma in modo incompleto. Dal punto di vista dell'agglutinazione T. V. non era

dunque nè un tifo, nè un paratifo B. E tuttavia le altre prove che eseguii poco dopo nei varii terreni differenziali, prove che è inutile stia a riferire minutamente, mi fecero ritenere che T. V. era un paratifo B inagglutinabile. Col tempo ho potuto persuadermi che esso era realmente un paratifo B, ed infatti, quando alcuni mesi più tardi rifeci una prova di agglutinazione, esso era agglutinato da un siero anti B appena meno del titolo limite.

Sebbene le prove istituite m'avessero dimostrato che T. V. era un ceppo tutt'altro che tipico, esso fu sottoposto egualmente alla sedimentazione, la quale ebbe solo per effetto di aumentare un poco la sensibilità al siero antipara B, confermando ancora una volta la diagnosi che di questo germe avevo precedentemente fatta.

Ciò che interessava di questo ceppo era il fatto che esso, già per altre esperienze ben conosciuto nelle sue proprietà culturali e antigeni e considerato come un bacillo di Eberth, dimostrava di aver subito spontaneamente una trasformazione nei suoi caratteri biologici. È notevole che il Prof. Lusena conservava indipendentemente questo stipite, il quale negli ultimi anni si era anche a lui dimostrato atipico per poca agglutinabilità da siero specifico e abnorme sensibilità al siero antiparatifo B. Avevo dunque una conferma che la singolare irregolarità da me riscontrata in T. V. non era dovuta a scambio di etichetta, ma che realmente questo stipite aveva subito col tempo delle trasformazioni tali da renderlo oggi eguale a un paratifo B.

***

Delle due osservazioni che ho riferito, sopratutto la prima doveva essere sottoposta, avanti di essere accettata, ad una critica severa. Posso escludere con sicurezza d'essere incorso in un errore banale, così d'aver scambiato provette, anche per il modo stesso con cui tale trasformazione è avvenuta.

Si poteva pensare che la cultura di T. I, fosse composta in parte di germi con i caratteri del tifo, in parte di germi paratifici B. Si noti che in questo caso la cultura doveva essere formata da un numero preponderante di bacilli tipici e da uno esiguo di paratifici B. Come concepire uno stipite originariamente così composto? E come spiegare che la sedimentazione favorisse lo sviluppo di questi germi a danno dei primi?

Il paratifo B ha è vero una resistenza maggiore del tifico alle condizioni sfavorevoli in genere, ma se generalmente la sedimentazione avesse favorito lo sviluppo del paratifo, non si potrebbe facilmente spiegare l'ipersensibilità di T. I al siero specifico nei primi 14 passaggi.

Io ritengo dunque che tanto nel primo che nel secondo caso, si tratti di una modificazione per la quale stipiti di bacillo di Eberth acquistarono caratteri appartenenti al paratifo B. Alcune poche osservazioni esistenti nella letteratura, mi fanno del resto accettare come verosimile, per quanto rara, questa evenienza, tralasciando, perchè suscettibili di interpretazione diversa, quelle che si riferiscono all'isolamento dallo stesso paziente, con emoculture eseguite in tempo diverso, di germi aventi prima il carattere del tifo, poi del paratifo B, mi limito a ricordare quanto comunicarono Köhlisch (1) e Lusena (2).

Köhlisch riferì di avere isolato dopo sei giorni da una cultura di tifo in liquido intestinale di vitello, un germe identico al paratifo B. Il ceppo di tifo era stato precedentemente sottoposto a isolamento ripetuto; il terreno culturale aveva subito, prima dell'insemenzamento, una sterilizzazione per un'ora a vapore fluente.

Lusena, trattando ripetutamente varii stipiti di B. Eberth con siero agglutinante antitifico, ottenne sempre l'acquisto della sieroresistenza mentre alcune volte le culture divenivano al tempo stesso agglutinabili dal siero antipara B.

Se a queste osservazioni si aggiungono le altre, invero numerose, che riguardano variazioni di entità più lieve in stipiti di b. di Eberth o paratifici o che si riferiscono all'isolamento di germi del gruppo non ben definibili dal punto di vista sistematico, si comprende come le modificazioni da me descritte debbano essere considerate come verosimili.

Ho la convinzione che tali fatti avvengano assai più spesso di quanto farebbero credere le scarse osservazioni in proposito, ma che essi sfuggano molte volte all'indagine, forse appunto per la loro singolarità.

---

(1) Köhlisch: *Herauszuchtung eines Paratyphus B. - Stammes aus einem Typhusstamm in Rinderdarmschleim* — « Centralbl. f. Bakt. ». I, Abt. Orig. Bd. 81, 1918, pag. 6.

(2) Lusena M.: *Modificazioni a tipo di mutazione provocate in culture di tifo per mezzo del trattamento con sieri immuni* — « Lo Sperimentale », 1926, fascicolo IV, pag. 417.

Il *Presidente* prega la Dott.ssa M. Bondioli di svolgere la sua comunicazione:

Contributo allo studio del comportamento del cloruro sodico sulla attività dei batteri lattici predominanti nel latte e nei formaggi.

Dott.ssa M. Bondioli: Particolarmente interessante per le deduzioni pratiche che se ne possono trarre mi è sembrato lo studio del comportamento di alcuni microrganismi predominanti nei prodotti di latteria rispetto alle azioni che determinate operazioni compiute nella preparazione dei formaggi possono esercitare sulla loro attività biologica e fisiologica; fra queste influenze ha attirato maggiormente la mia attenzione la salatura, operazione che, come si sa, serve ad introdurre nella pasta dei caci una determinata quantità di cloruro sodico.

Generalmente tale quantità oscilla fra il 2-3 %, talora raggiunge il 4 %. Ora se consideriamo la percentuale di sale non soltanto rispetto a tutta la massa del formaggio, ma rispetto alla quantità di umidità in esso contenuta, cioè se osserviamo la concentrazione della soluzione salina che effettivamente circola nei formaggi, troviamo che, mentre nei caci molli, dove il percento d'umidità è relativamente alto (circa il 50 %), detta soluzione avrà una concentrazione del 5-6 % di Na Cl, nei formaggi a pasta più asciutta(in cui l'umidità non supera il 30 %) la concentrazione sarà di circa il 10 % ed infine nei tipi « pecorino » con un'umidità del 25 % ed una salatura del 4 %, la concentrazione salina può anche raggiungere il 16-18 %; cifre quindi notevoli.

È risaputo che lo scopo della salatura è triplice: essa infatti migliora i caratteri organolettici dei prodotti, favorisce per processo osmotico la fuoruscita di una maggior quantità di siero dalla pasta del cacio e da ultimo è un importante agente modificatore delle fermentazioni che vi si compiono per opera di speciali microrganismi e che costituiscono nel loro insieme il complicato fenomeno della maturazione. Quindi l'interesse di vedere come ne sia in vario modo influenzata la vita delle singole specie microbiche.

L'azione delle concentrazioni di cloruro sodico sulla vita e sulle proprietà dei microbi fu studiata fin'ora relativamente assai poco. Alcuni schizomiceti resistenti al sale sono citati nelle generalità mi-

crobiologiche dal De' Rossi e dal Küster; assai recentemente Golikowa ha studiato qualche batterio alofilo obbligato.

Nel campo specifico della batteriologia casearia Sayer, Rachn e Farrand, quasi contemporaneamente ad Otto Fettick, e da ultimo Clayton si occuparono dell'azione del sale sui microbi tipici del burro; Boekhout ed Ott de Vries fecero ricerche sull'influenza del cloruro sodico e dell'acido lattico su certi gasogeni; recentemente l'Arnaudi studiò l'azione dell'Na Cl su alcuni ceppi di penicilli del gorgonzola. Però, salvo l'ultimo lavoro citato, si presero generalmente in considerazione concentrazioni saline relativamente basse ed inferiori a quelle che si hanno naturalmente nella pasta dei caci.

Le presenti ricerche avevano perciò lo scopo di studiare il comportamento di alcune specie microbiche predominanti nel latte e nei formaggi, rispetto a concentrazioni saline piuttosto elevate. I terreni nutritivi usati furono il più possibile vicini a quelli che costituiscono la sede normale dei microrganismi caseari, cioè il latte ed il siero latteo, liberato dall'albumina e peptonato, colle concentrazioni saline del 0,5-10 %. I microrganismi studiati furono 5 e precisamente: un micrococco fluidificante isolato dal latte, uno streptococco debolmente acidificante ed un bastoncino tipo « Bacterium casei » isolati entrambi dal siero latteo dopo lavorazione; un bastoncino tipo « Bacterium casei α » isolato da un formaggio grana lodigiano, ed un cortissimo bastoncino tipo « coli aërogenes » isolato dalle feci bovine e frequentissimo abitatore del latte e dei formaggi dove determina il caratteristico « gonfiore ».

L'influenza del cloruro sodico sull'attività di tali microrganismi fu seguita mediante determinazioni acidimetriche fatte dopo periodi di 6 in 6 giorni per entrambe le serie di culture in latte ed in siero; l'acidità totale venne ottenuta mediante titolazione con Na OH n/10, l'acidità ionica fu determinata coll'ionoscopio colorimetrico a scala fissa, metodo Michaelis. I dati ottenuti vennero riportati in diagrammi in modo da avere le curve rappresentative della variazione dell'acidità totale ed ionica in funzione del tempo.

Pur non volendo generalizzare in modo assoluto le osservazioni fatte nel corso di queste esperienze, ne riassumiamo qui i risultati:

1° Lo stesso microrganismo, a parità di condizioni, produce gradi di acidità diversi nei differenti terreni culturali.

2° Lo stesso microrganismo, coeteris paribus, è influenzato in modo diverso dalla stessa concentrazione salina nei vari mezzi nutritivi.

3° L'acidità totale e l'acidità ionica prodotte da un medesimo microrganismo a parità di condizioni sono influenzate dalla stessa concentrazione di cloruro sodico in modo diseguale ed indipendente.

4° Generalmente la concentrazione salina del 5 % è sopportata meglio di quella del 10 % : tuttavia l'effetto non è direttamente proporzionale alla quantità di Na Cl presente.

5° Talvolta le due concentrazioni hanno la stessa influenza riguardo alla produzione di acidità : ciò avviene per i microrganismi a forma coccica che pare sopporti meglio la presenza del sale.

6° In genere l'influenza esercitata dall'aggiunta di cloruro sodico è sentita assai più fortemente dagli schizomiceti produttori di alte acidità (di solito forme bacillari) che non, come s'è visto, dai più debolmente acidificanti (forme cocciche).

7° La produzione di acidità in mezzi salati avviene talvolta solo dopo un certo periodo di tempo ; parrebbe che l'azione inibitrice del sale venga vinta col tempo da un fenomeno di adattamento alla concentrazione salina da parte degli stessi microrganismi ; però per poter asserire decisamente ciò sarebbe forse bene proseguire più a lungo le esperienze ed eseguirle su maggior numero di specie microbiche.

Seduta pomeridiana del 22 Marzo 1930

Presiede il Prof. S. Belfanti.

Il *Presidente* prega il Prof. G. Favilli di svolgere la sua relazione:

Il problema etiologico ed epidemiologico della febbre ondulante.

Prof. G. Favilli: Nel riferire obbiettivamente dello stato attuale delle questioni che si connettono alla eziologia e alla epidemiologia della febbre ondulante, credo non si possa fare a meno di ricordare, a mo' di premessa, che lo studio di questa malattia soprattutto per quanto riguarda le modalità con cui si trasmette all'uomo è assai più importante oggi di quanto non lo fosse nei tempi passati per la ragione che essa è attualmente molto più diffusa di una volta. Essa si manifesta ora in regioni nelle quali fino ad ieri era sconosciuta, e moltissimi sono i paesi colpiti; nuove fonti di contagio, i bovini, le pecore, i suini sono accertate, altre non sono note ma pure debbono esistere se per concorde parere di molti epidemiologisti è talvolta impossibile accertare l'origine dell'infezione; si è dovuto porre il quesito della duplicità o della unicità dell'agente eziologico, problema questo che più di ogni altro ha richiamato l'attenzione degli studiosi: tutto ciò giustifica l'interesse che si è creato per questa forma morbosa negli ultimi anni.

Le ricerche che da quasi un decennio vengono condotte sulla eziologia e sulla epidemiologia della febbre ondulante costituiscono un materiale abbondantissimo di cui non sempre è facile valutare l'importanza o l'esattezza; vi sono ancora dei punti controversi sui quali è difficile pronunziarsi: ciò nonostante, se ancora non può essere detta su questi problemi l'ultima parola, pure è già possibile attualmente inquadrare entro linee abbastanza ben definite ciò che si può dedurre dalle osservazioni epidemiologiche e dalle numerosissime ricerche sull'agente patogeno.

Prima di esporre quanto è stato fatto nel campo batteriologico converrà esaminare come la malattia è distribuita nei vari paesi, come si è estesa specialmente negli ultimi anni, e quali sono le cause accertate o supposte del contagio umano.

Distribuzione della febbre ondulante.

Inutile esporre dettagliatamente la distribuzione e la diffusione della malattia nei paesi che si affacciano al bacino mediterraneo poichè l'epidemiologia di queste regioni è assai ben conosciuta. Qui la malattia, da poi che è stata individuata nella sua entità eziologica, è stata osservata — si può dire senza tema di errore — dovunque: tanto che fino a poco tempo fa la prevalenza della infezione nei paesi mediterranei le valse il nome di febbre mediterranea. Causa più comune della infezione: dovunque la capra, e spesso — specialmente negli ultimi anni constatata con più frequenza — la pecora.

Da qualche anno l'infezione è segnalata in aumento in moltissimi luoghi: si sono verificate delle epidemie ove nel passato si era soliti riscontrare la malattia in forma endemica o sporadica. In Algeria ad es. (1), ove nel ventennio precedente al 1926 non erano stati individuati che casi sporadici, per quanto frequenti, si è constatato in quell'anno nella regione di Orano un rilevante numero di casi accertati serologicamente. In Tunisia l'infezione si è estesa negli ultimi anni: nella sola Tunisi debbono essere calcolati come minimo 300 casi all'anno.

Risulta dai vari rapporti epidemiologici che mentre prima la malattia era più o meno limitata ai territori prospicienti il bacino mediteraneo, essa ha ora tendenza a penetrare nell'interno; ciò è particolarmente evidente in Francia ed in Ispagna, data l'estensione in profondità dei due continenti.

In Ispagna infatti la malattia è presente allo stato endemico nelle regioni che si affacciano al Mediterraneo, con recrudescenze però a tipo epidemico. Ma anche nelle altre zone e nelle città numerosi casi sono registrati, e negli ultimi anni sono in aumento. Dall'insieme delle notizie appare che la Spagna è particolarmente colpita dalla infezione, la quale talora ha raggiunto una gravità non comune. Secondo De Partearrojo (2) l'infezione è quasi sempre

(1) Raynaud: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.* 1926, pag. 1405.
(2) De Partearrojo: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1927, pag. 1462.

da riportare alle capre, il che è dimostrato dal fatto che la frequenza della malattia è in rapporto col numero delle capre presenti nelle varie regioni.

In Francia, stando al rapporto fatto nel 1925 da Aublant, Dubois, Lafenètre e Lisbonne (1), risulta che allora la malattia era sicuramente accertata in 14 Dipartimenti, sui 90 nei quali l'intera Francia è suddivisa. Sono i Dipartimenti che *grosso modo* si affacciano al Mediterraneo. In questi l'infezione arreca danni non lievi: nella Provenza, ad esempio, nel quinquennio 1920-1925 ne sono stati individuati 904 casi. Esistono quivi pecore e capre infette, nelle quali spesso l'infezione si manifesta con epidemie di aborto. Nel resto della Francia fino ad allora l'infezione non fu individuata, mentre vi è assai comune l'aborto bovino, che invece è raro nei Dipartimenti colpiti da febbre ondulante. Anche in Francia, oltre ai focolai epidemici ed endemici si riscontrano ogni tanto casi isolati: a Parigi, ad es., nel 1928 furono descritti 5 casi autoctoni e tutti di origine caprina. Talvolta poi si verificano vere e proprie epidemie. In un successivo recentissimo rapporto dettagliato Aublant e Lisbonne (2) dicono che la diffusione della febbre ondulante è aumentata: sono ora 17 i Dipartimenti in cui la si riscontra abitualmente e ove prende talvolta andamento epidemico. Sono aumentate le segnalazioni di casi sporadici in distretti finora indenni a colpa secondo Aublant e Lisbonne delle migrazioni dei greggi infetti. Pare che in Francia più che la capra sia la pecora responsabile del diffondersi dell'infezione: infatti in alcune regioni più colpite dalla infezione la capra è piuttosto rara mentre sono numerosi i greggi di pecore. La capra è invece quasi sempre causa dei casi che si osservano isolati ed in regioni ove d'abitudine non vi è febbre ondulante.

In Italia la malattia è stata sempre endemica nelle regioni dell'Italia meridionale, ove esiste parecchio bestiame caprino e ove si fa molto uso del latte di questi animali. In Toscana si sono avute con una certa frequenza epidemie abbastanza gravi, legate anch'esse alla presenza di capre; ma anche all'infuori di queste epidemie, l'ultima delle quali, grave e assai diffusa si riscontrò nel 1925 (3),

---

(1) Aublant, Dubois, Lafenètre et Lisbonne: *Revue d'Hyg.*, vol. 47, 1925, pag. 1090.

(2) Aublant et Lisbonne: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1929, pag. 715.

(3) Favilli: *Lo Sperimentale*, 1926, pag. 41.

non sono mai mancati in Toscana casi isolati, anzi in questa terra, come nelle regioni meridionali e nelle isole, può dirsi che l'infezione esista endemica. Nelle altre regioni italiane, e segnatamente in quelle settentrionali, i casi constatati sono sempre stati rari e sporadici. Da qualche anno la febbre ondulante è segnalata in forte aumento nell'Emilia, e non soltanto a causa dell'accertato contagio da bovini; prima invece in questa regione non si verificavano che molto raramente dei casi sporadici.

Una fonte di contagio che era già conosciuta ma che negli ultimi anni è stata causa di notevoli epidemie, è la pecora: oltre a vari casi sporadici ogni tanto osservati, sono state descritte vere e proprie epidemie causate dalle pecore come, ad es., quella tipica osservata lo scorso anno in Toscana (Favilli) (1): si trattava di una epidemia provocata esclusivamente dall'uso di latte e latticini freschi provenienti da un gregge composto di sole pecore nelle quali si erano verificati pochi mesi prima parecchi casi di aborto, e buon numero delle quali presentava siero-agglutinazione positiva.

Questo in breve quanto si è verificato lungo il settore occidentale del Mediterraneo: per ciò che riguarda il settore orientale le notizie sono più imprecise perchè i dati statistici vengono raccolti con minore esattezza. Risulta però che la febbre ondulante è in aumento, ad es., in Egitto, e che sono stati individuati qua e là nuovi focolai d'infezione anche nelle regioni, come la Palestina e l'Asia Minore (2), ove la febbre ondulante è da lungo tempo endemica.

Si può dunque dire che in tutto il bacino mediterraneo la febbre ondulante è da vari anni in aumento; che vi è una tendenza generale alla penetrazione della malattia verso l'interno; che è stato frequente il manifestarsi in diversi punti di vere e proprie epidemie. A che cosa questi fatti siano dovuti non sempre è facile dire: è certo che in alcune regioni, come ad es. nella Francia il diffondersi dell'infezione è legato assai spesso alla maggior mobilità che hanno i greggi; più frequenti i transiti da una regione all'altra, più facili e più rapidi gli scambi.

È certo altresì che, per l'attenzione che è stata dovunque richiamata su questa malattia e per il maggiore uso che si fa della sierodiagnosi, sono attualmente riconosciuti parecchi casi che una volta sarebbero rimasti senza diagnosi: tutti gli epidemiologisti infatti

(1) Favilli: *Lo Sperimentale*, 1929, pag. 515.
(2) Sdrodowski: *Arch. f. Schiffs und Trop. Hyg.*, 1927, vol. 31, pag. 301.

sono concordi nel riconoscere che va tenuto il debito conto anche di questi fattori prima di parlare di aumento in senso assoluto della diffusione della febbre ondulante.

Anche all'infuori del bacino mediterraneo la febbre ondulante è assai diffusa; nè insisterò nell'illustrare i luoghi nei quali essa è segnalata poichè i resoconti epidemiologici sono abbondantissimi, e a tutti noti. È soltanto da ricordare che le constatazioni di una maggior diffusione della infezione sono state fatte un po' dappertutto: maggior numero di casi sporadici, maggior frequenza di focolai epidemici. A spiegare tanto gli uni che gli altri possono essere avanzate le stesse ipotesi di cui si è detto a proposito della infezione lungo i paesi mediterranei.

Ma di una importante questione principalmente gli epidemiologisti si sono dovuti occupare in questi ultimi tempi: cioè dell'accertamento della esistenza di nuovi veicoli d'infezione, riscontrati sia nei luoghi ove già da tempo la malattia esisteva, sia in luoghi ove la comparsa di questa è esclusivamente legata alla nuova e fino a pochi anni fa insospettata causa di infezione. Da meno di un decennio i bovini sono stati riconosciuti capaci di provocare all'uomo una forma clinicamente identica alla febbre ondulante trasmessa dalle pecore e dalle capre: responsabili del contagio sono le vacche colpite dall'aborto epizootico. Un'altra causa, sebbene di gran lunga meno frequente di questa, ma pure sicuramente in qualche luogo accertata, per es. in America, è costituita dalla possibilità della trasmissione dai suini colpiti anche essi dall'aborto epizootico.

L'accertamento di queste nuove forme di contagio ha oltrepassato, per così dire, il limite della semplice constatazione epidemiologica, poichè dopo la scoperta delle grandissime analogie esistenti fra il comune agente della febbre mediterranea, il brucella melitensis, (una volta micrococcus melitensis) e quello dell'aborto epizootico, il brucella abortus (una volta bacillus abortus Bang) ritenuto privo di potere patogeno per l'uomo, è stato posto il problema se il Br. abortus ha o no questo potere, ed in caso negativo quale è la vera natura della infezione bovina e suina che può essere trasmessa all'uomo. Su tali questioni, che si prospettano oggi nello studio della eziologia ed epidemiologia della febbre ondulante, moltissimo è stato fatto e detto; ed invero non si può dire che, forse, talvolta la discussione non si sia troppo allontanata dalla semplice constatazione dei fatti. Dei quali oggi, per l'opera assidua di parecchi ricercatori

è stata raccolta copia tale che la vera essenza di questa dibattuta questione epidemiologica appare abbastanza chiara, se non ancora del tutto definita.

Distribuzione della febbre ondulante di origine bovina e suina. Rapporti di queste forme di infezioni con quella di origine caprina e ovina.

Negli Stati Uniti d'America già da lungo tempo erano noti i casi di infezione trasmessa dalle capre, i quali peraltro fino agli ultimi anni si constatavano nelle regioni limitrofe al Messico, ove vi è abbondantissimo allevamento di questi animali: infatti inchieste molto precise compiute da medici militari dal 1911 fino al 1922 accertarono che la febbre ondulante esisteva in forma endemica in vari Stati del sud e dell'ovest degli Stati Uniti e che la causa del contagio era la capra. Per la maggior diffusione degli esami siero-diagnostici la malattia è conosciuta ora in parecchi altri Stati, tanto sulla costa atlantica che pacifica. Ma è in America che sono stati identificati i primi casi di infezione per contagio dai bovini (Keefer, Baltimora 1924); e di questi casi se ne conoscono oggi moltissimi. La frequenza della infezione umana da bovini appare in America più elevata che in qualsiasi altro paese, tanto che è stato affermato, senza peraltro che questa ipotesi sia stata confermata, che si riscontra oggi in America del nord un maggior numero di casi di febbre ondulante che non di tifo (Tagliaferro Clark) [1]. Dal momento in cui la forma da contagio bovino fu individuata fino al dicembre 1927 furono accertati in 20 Stati 195 casi (Tagliaferro Clark); nel biennio 1927-1928 nel solo Stato di Jowa sono stati osservati 83 casi (Hardy); 31 da Huddleson nello Stato di Michigan. Ciò dimostra la frequenza della infezione; e da allora ad oggi un numero grandissimo di casi è stato reso noto. La malattia è quasi sempre sporadica; il contagio avviene o per ingestione del latte crudo o per contatto diretto con animali infetti: ne sono per queste ragioni specialmente colpiti gli agricoltori e coloro che lavorano nei mattatoi.

Per quanto con frequenza assai minore, sono stati segnalati negli ultimi anni casi di infezione umana per contagio di suini colpiti dall'aborto epizootico. In America l'aborto è molto diffuso fra

---

[1] Tagliaferro Clark: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1927, pag. 1460.

i suini, e causa in capo all'anno ingentissimi danni. I casi di infezione da suini si verificano quasi senza eccezione fra il personale addetto ai mattatoi.

Quasi contemporaneamente alle comunicazioni degli americani furono osservati in Rhodesia dei casi di febbre ondulante per i quali non poteva essere invocata come causa contagiante la capra: la presenza invece di aborto epizootico fra i bovini, la frequenza della infezione umana nei luoghi ove esisteva l'infezione bovina e il fatto che questa ultima precedeva con regolarità il manifestarsi della prima, posero in luce questa forma di contagio fino ad allora insospettata. Vedremo meglio più avanti l'importanza che acquistano i casi osservati in Rhodesia per lo studio dell'agente causale della malattia.

Una volta richiamata l'attenzione sulla possibilità di un contagio bovino, le osservazioni si sono moltiplicate in tutti i paesi ed oggi esso è segnalato quasi ovunque. Se il contributo d'infezioni umane che esso porta alla somma totale dei casi di febbre ondulante si mantiene in alcuni paesi più basso di quello che non sia da attribuire alle capre e alle pecore, in altri paesi il numero dei casi dovuto al contagio bovino uguaglia e supera quello dei casi dovuti a questa ultima forma di infezione.

Le osservazioni compiute in seguito a quelle della Rhodesia e Nord America hanno contribuito a rendere sempre meglio nota l'epidemiologia della febbre ondulante da bovini; quelle recentissime inoltre hanno permesso di stabilirne alcune caratteristiche fondamentali.

In Italia queste osservazioni furono fino al 1927 più numerose che altrove e furono quelle che per alcune peculiari particolarità destarono un maggiore interesse e si prestarono a differenti interpretazioni sulla vera natura dell'agente patogeno. È il Manzini [1] che per primo descrive nel 1924 nella provincia di Bologna tre casi di infezione umana nei quali il contagio bovino era manifesto: si trattava infatti di due veterinari e di un contadino che avevano avuto contatto con vacche colpite da aborto. Nel 1925, per opera di Ficai e Alessandrini [2] è descritta una vera epidemia in provincia di Arezzo, assai importante: questa è, se non l'unica, una delle pochissime volte in cui la diffusione dell'infezione dai bovini all'uomo abbia assunto carattere spiccatamente epidemico, mentre di solito,

(1) Manzini: *La Nuova Veterinaria*, 1925.
(2) Ficai e Alessandrini: *Annali d'Igiene*, 1925, anno XXXV, fasc. 1.

come già si è detto, la infezione da bovini si manifesta specialmente con casi sporadici. Nella epidemia di Arezzo, oltre alla forte contagiosità della malattia era da rilevare l'assenza completa di capre dalla regione colpita.

Quasi contemporaneamente sono segnalati casi di contagio umano da vaccine in Piemonte: si tratta qui di piccole epidemie sparse, avvenute in corrispondenza di focolai di aborto epizootico, e di casi riscontrati nella città di Torino, nei quali frequentemente l'infezione era da collegare con l'ingestione di latte vaccino supposto infetto.

Dopo queste prime segnalazioni parecchi altri casi di infezione umana da bovini sono registrati: si tratta per lo più di casi isolati che riguardano individui che hanno avuto contatto con vaccine colpite da aborto o che hanno bevuto latte vaccino infetto. Questi casi sono stati osservati un po' dappertutto, in Emilia, in Toscana, nel Lazio, in Piemonte, in Romagna, nel Veneto. Nell'Emilia le segnalazioni di contagio da bovino sono in continuo aumento. Un'accurata statistica di Piva (1), registra nella sola provincia di Bologna 86 casi dal 1° gennaio 1927 al dicembre 1928: in un'altissima percentuale l'infezione era in rapporto diretto con focolai di aborto epizootico. In Romagna sono stati pure identificati negli ultimi tempi casi di febbre ondulante in numero considerevole (Giugni) (2), o sporadici o raggruppati in piccoli focolai: nella grande maggioranza esisteva un rapporto diretto con l'aborto bovino ed in piccola percentuale anche con l'aborto delle pecore. In un caso fu potuta anche individuare la causa nell'aborto di una cavalla. Da comunicazioni orali mi risulta che anche nella provincia di Padova e nel Veneto in genere sono frequentissime le segnalazioni di infezioni umane da aborto bovino.

Dopo i casi italiani c'è voluto un certo tempo perchè in Europa fossero segnalate delle infezioni da bovini. Nonostante che l'allarme gettato dalle constatazioni fatte in America, in Rhodesia e in Italia abbia fatto intensificare la vigilanza, pure in Francia, ad es., non sono noti a tutt'oggi che tre casi di contagio sicuramente da bovini (3). Eppure l'aborto epizootico in Francia è diffusissimo.

In Ispagna, ove la febbre ondulante è ben conosciuta ed è di

(1) Piva: *Arch. Ital. di Sc. Med. Colon.*, 1929, n. 12, pag. 594.
(2) Giugni: Soc. Med. Chir. della Romagna; in: *Rif. Med.*, 1927, n. 18, p. 427.
(3) Aublant e Lisbonne: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1929, n. 10, pag. 1718.

regola veicolata dalla capra, ed ove anche l'aborto epizootico bovino esiste, di contagio da bovini non sono stati segnalati che i casi Santos (1).

Stando così i fatti fino a questo momento l'epidemiologia della febbre ondulante poteva essere così tratteggiata. Questa malattia nella più grande maggioranza dei casi è trasmessa all'uomo dalla capra o in talune regioni (Francia) e talune volte (epidemia descritta da Favilli) in forma epidemica dalla pecora. È possibile il contagio per mezzo dei bovini (o suini) colpiti da aborto epizootico: però questa forma di contagio offre le seguenti particolarità:

1° si manifesta generalmente con la comparsa di casi sporadici e non ha nessuna tendenza a dare vere e proprie epidemie, come accade invece spesso quando il veicolo dell'infezione è la capra;

2° ha colpito finora regioni ove da lungo tempo la febbre ondulante contratta dalle capre è ben nota;

3° rappresenta una forma d'infezione eccezionale, poichè in moltissime regioni ove l'aborto epizootico è diffusissimo tra il bestiame, e dove logicamente dovrebbero riscontrarsi casi di contagio umano, questi invece sono mancati del tutto.

Essendo le cose a questo punto, con dati così frammentari e in contrasto fra loro, non era facile certamente decidere del valore che si doveva attribuire al bacillo di Bang per ciò che riguarda la patologia umana. È o non è il bacillo di Bang patogeno per l'uomo? È questa la domanda che ha avuto molte risposte contraddittorie, giustificate dalla irregolarità dei rilievi epidemiologici e dei contributi che alla batteriologia di questo microrganismo sono stati apportati di recente in grande numero. Non è certo facile attribuire potere patogeno per l'uomo ad un microrganismo che non lo dimostra proprio nelle condizioni migliori nelle quali il contagio potrebbe verificarsi: infatti nelle zone più colpite dall'aborto epizootico bovino sono mancati fino a non molto tempo fa casi di infezione. Le ricerche batteriologiche d'altro canto dimostravano la perfetta identità tra l'agente causale della malattia trasmessa dalle capre e quello della malattia trasmessa dai bovini: gli invocati criteri differenziali fallivano senza eccezione nelle prove di controllo e all'atto pratico. Una sola prova resisteva ad ogni critica e sembrava aver portato un contributo di fondamentale importanza alla soluzione del problema: quella della dimostrazione sperimentale della

(1) Novoa Santos: *Arch. de Med. Cir y Espec.*, 1929, n. 25, p. 720.

mancanza di potere patogeno del bacillo di Bang per l'uomo. Così, con un dato di fatto inoppugnabile da un lato, cioè la constatazione della possibilità di contagio bovino; e con dati nettamente opposti dall'altro, e cioè mancanza di casi umani in corrispondenza dei più vasti focolai di aborto bovino, mancata dimostrazione sperimentale del potere patogeno di Bang per l'uomo, accertata identità biologica di quest'ultimo verso il micrococco melitense, le nuove acquisizioni sulla epidemiologia della febbre ondulante non trovavano una sicura spiegazione. Predominavano è vero coloro che consideravano il bacillo di Bang dotato di potere patogeno per l'uomo, per quanto scarso ed eccezionale tale potere fosse; ma è stata sostenuta, e lo è tuttora da alcuni, invece, la possibilità che il bacillo di Bang sia sempre privo di potere patogeno e che anche della infezione umana da bovini sia responsabile il Br. melitensis, ospite oltre che delle capre anche delle vacche.

Oggi però le condizioni di fatto sono mutate. Si posseggono nuovi dati epidemiologici della massima importanza e lo studio batteriologico delle Brucella ha fatto notevoli progressi. Molti dei dubbi che giustamente si affacciavano fino a qualche tempo fa sono dissipati, ed attualmente ci si può abbastanza chiaramente rendere conto sia dei rapporti che intercorrono tra i vari rappresentanti del gruppo delle Brucella, sia della loro importanza nella patologia. Conviene ora esaminare dettagliatamente i fatti che si sono osservati in alcune regioni di Europa in questi ultimi anni a riguardo della possibilità di un contagio umano per mezzo dei bovini: sono particolarmente queste constatazioni che hanno permesso di stabilire il preciso posto che spetta al Br. abortus nella patologia umana.

Germania e *Austria*. — In Germania fino al 1926 la febbre ondulante non era conosciuta: ben noto era invece l'aborto epizootico bovino. Nell'ottobre 1926 è Steinert (1) che per primo riferisce un caso di infezione in un veterinario che si ammalò rispettivamente dopo 16 e 10 giorni dall'aver levato due aborti dalle vacche. La forma fu accertata serologicamente. Nel luglio 1927 Kreuter (2), descrive un caso analogo in altro veterinario; nell'ottobre un caso identico è osservato da Dietel (3). Stabilita così la possibilità di un contagio umano dai bovini colpiti da aborto epizootico le osser-

(1) Steinert: *Münch. Tierärzt. Woch.*, 1926, 77, pag. 73.
(2) Kreuter: *Klin, Woch.*, n. 29, 1927, pag. 1380.
(3) Dietel: *Münch. Med. Woch.*, 1927, 74, pag. 1704.

vazioni si moltiplicano rapidamente: Poppe (1), riporta la seguente tabella che riassume tutti i casi di febbre ondulante osservati in Austria e Germania a tutto il 1928.

Anno	Autore	N.° casi	Diagnosi	Causa del contagio
1926	Kreuter	1	Orchi-epididimite, febbre	Asport. di placenta ad una vacca
1926	Steinert	1	Non specificata	Contatto con ab. bov.
1927	Dietel	1	Enterite	Asport. di placenta
1927	Veilchenblau	1	Non specificata	Asportaz. di plac.
1928	Burger e Habs	4	Infez. da bac. Bang	Latte di vacca
1928	Burger in tutto (non pubbl.)	25	Infez. da bac. Bang	—
1928	Hegler	3	Febbre ondulante	Non accertata
1928	Spengler	3	Infez. da bac. Bang	Contatto con ab. bov.
1928	Prausnitz	13	Infez. da bac. Bang	5 contatti da aborto bovino, 5 da latte, 3 indeterminati
1928	Poppe	11	Infez. da bac. Bang	6 da latte, 2 da contatto con ab. bov. 3 indet.
1928	Curschmann	2	Infez. da bac. Bang	Latte e contatto dir.

Sono in tutto 65 casi: non sono molti se si pensa alla estensione dell'aborto epizootico nelle regioni ove i casi sono stati accertati. Ciò va tenuto presente poichè dimostra che questo genere d'infezione è piuttosto raro a verificarsi, nè ha tendenza a estendersi o a dare epidemie. Non risulta infatti da tutta la letteratura tedesca che vere e proprie epidemie si siano verificate. Anche nel decorso anno sono stati osservati vari casi che rivestono gli stessi caratteri di quelli riportati da Poppe. Nella epidemiologia della febbre

(1) Poppe: in Kolle, Kraus, Uhlenhuth: *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, 1927, terza edzione, Fischer, Jena.

ondulante questi casi d'infezione descritti in Germania segnano una data veramente importante. In regioni dove l'aborto epizootico è ben noto da lungo tempo ci si accorge per la prima volta che gli animali colpiti da questa malattia possono contagiare l'uomo: la possibilità di tale contagio già accertata in altri paesi fa sì che la febbre ondulante venga riscontrata anche in Germania fino allora ritenuta esente, non appena vi si porti l'attenzione. Nè crediamo che prima del 1926 essa non esistesse: è molto più logico pensare che prima d'allora semplicemente non fosse conosciuta e che di fronte a infezioni di dubbia natura non nascesse il sospetto della possibilità di una tale malattia. Va ricordato che dalle dichiarazioni di alcuni ammalati risulta che erano da tempo note nelle regioni ove esiste l'aborto epizootico delle malattie febbrili non chiaramente diagnosticate, che colpiscono sia i veterinari stessi sia coloro che custodiscono il bestiame. Si pensi anche che assai spesso i casi di infezione sono stati diagnosticati non già per un sicuro orientamento preso dai medici in base a criteri clinici od anamnestici, ma invece soltanto a mezzo delle prove siero-diagnostiche, saggiando la agglutinabilità verso il Br. abortus di numerosi sieri in esame provenienti da casi di infezione di dubbia natura. Il crescente numero dei casi segnalati in America e in Italia, ha messo in allarme i medici, che hanno indagato ogni qualvolta le condizioni locali e la storia dei loro ammalati potessero far pensare ad un'infezione contratta da bovini colpiti da aborto; e così è venuta a formarsi la casistica tedesca. Niente di più logico quindi che il concludere che non vi è nessun luogo ad attribuire al bacillo di Bang un potere patogeno che prima non aveva od anche, come da altri si vuole, a supporre che si sia da pochi anni iniziata, per varie cause, una nuova forma di aborto epizootico fra i bovini sostenuto dal Br. melitense e contagioso quindi per l'uomo. Basta più semplicemente pensare che ora si è riusciti a riconoscere una malattia assai poco bene individuabile clinicamente e della quale per di più esisteva una fonte di contagio finora insospettata. A conferma di questo modo d'interpretare i recenti dati epidemiologici della febbre ondulante, è utilissimo esaminare ciò che è avvenuto in alcuni paesi del nord Europa: Danimarca, Svezia, Olanda, Inghilterra.

Danimarca. — In Danimarca non erano stati riconosciuti prima del 1° aprile 1927 casi di febbre ondulante, mentre a quell'epoca erano già noti in Europa i casi di infezione da bovini descritti in

Italia da Ficai e Alessandrini e Manzini, in Germania il caso di Kreuter, in Francia quello di Giraud. In Danimarca, ove l'allevamento del bestiame bovino si pratica su larghissima scala, l'aborto epizootico è diffuso quasi ovunque. Vi è a Copenaghen l'Istituto Sieroterapico di Stato che funziona come laboratorio centrale di diagnosi batteriologica e serologica, e vi affluiscono quindi fra l'altro dalle varie parti un gran numero di campioni di sangue per le necessarie prove. A cominciare da questa epoca tutti i sieri inviati per la diagnosi del tifo e dei paratifi furono esaminati anche riguardo al loro potere agglutinante rispetto al Br. abortus. Contrariamente all'aspettativa, poichè fino ad allora non si erano mai avute notizie indicanti la presenza di febbre ondulante sia di origine caprina che di origine bovina, le reazioni positive furono tutt'altro che rare. Dall'aprile 1927 al dicembre 1928 sono stati esaminati 4600 sieri e ne sono stati trovati 500 in cui l'agglutinazione era positiva almeno alla diluizione di 1 : 100; nella maggioranza dei casi alla diluizione di 1 : 400 ed oltre. Dal dicembre 1928 al giugno 1929 sono stati trovati altri 223 sieri a reazione positiva. Accertato così un numero tutt'altro che indifferente di sieri a reazione positiva, l'indagine è stata rivolta ad individuare il quadro clinico e la sorgente della infezione, e contemporaneamente è stato fatto in parecchi casi l'isolamento del germe, sulle cui caratteristiche torneremo in seguito. Clinicamente le forme rientravano nel quadro classico della febbre ondulante: lo studio epidemiologico inoltre ha rivelato vari punti di grande interesse.

Le capre esistenti in Danimarca sono in numero assai esiguo, circa 40.000, in confronto di circa 2.500.000 di capi di bestiame bovino (Madsen) [1]; non sono mai state colpite da aborto, nè si è potuto stabilire in alcun caso qualche indizio che permettesse di attribuire ad esse l'infezione. Le capre d'altronde anche prima di ora non si erano mai rivelate trasmettitrici di malattia all'uomo. Nella grandissima maggioranza dei contagiati si è potuto accertare l'infezione per mezzo delle vacche colpite da aborto o per l'ingestione di latte o panna cruda: è estremamente piccola la percentuale di casi in cui non è stato possibile individuare la causa del contagio. I colpiti sono molto più numerosi nelle campagne (e in queste tra gli allevatori di bestiame ovino) che non nelle città. Secondo Kri-

(1) Madsen: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1928, pag. 1695.

stensen (1) la malattia non è nuova in Danimarca, ma è soltanto nuova la sua scoperta; ciò in accordo con alcuni dati retrospettivi, e col fatto che nel periodo di tempo in cui sono state compiute le indagini — periodo abbastanza lungo — la sua frequenza si è dimostrata assai costante.

Lo studio epidemiologico della febbre ondulante, che in Danimarca è stato condotto con grande precisione, ha fra l'altro rivelato che i casi si manifestano quasi sempre isolatamente ed apparentemente in maniera del tutto accidentale in tutte le località di questa regione; sono naturalmente più frequenti dove la popolazione è meno addensata. Non è stato mai constatato più di un caso in una stessa famiglia: il che testimonia dello scarso potere infettante del Br. abortus (Kristensen).

I dati che sono venuti in luce dallo studio sistematico compiuto in Danimarca sono della massima importanza ed hanno fatto fare un grande progresso alle conoscenze che fino ad ora si avevano sulla infezione trasmessa dai bovini, alla quale oggi è possibile di assegnare una individualità assai precisa. Ricordiamo soltanto a questo punto che le principali caratteristiche della epidemiologia danese sono: non presenza di capre infette; mancanza assoluta di contagio umano per mezzo di questi animali; mancanza di focolai epidemici; scarso potere contagiante da parte del germe che è causa della malattia. Vedremo in seguito che cosa suggeriscono queste conclusioni.

Svezia. — L'infezione si presenta in questa regione con discreta frequenza. Sono stati raccolti dal dicembre 1927 all'agosto 1928 73 casi (Kling) (2), di 64 dei quali si posseggono dati anamnestici e storie cliniche complete. Anche qui, come in Danimarca, la malattia fu scoperta mediante l'esame serologico: dopo la constatazione dei primi casi cominciarono le indagini sistematiche, che dimostrarono che essa è frequente quanto il tifo e più del paratifo *B*, e che esiste una relazione intima fra infezione umana e aborto bovino. I casi riscontrati si sono verificati tutti nelle parti della Svezia in cui il bestiame bovino è infetto di aborto epizootico: la malattia è più frequente ove maggiore è il numero degli animali infetti. Il contagio diretto e l'ingestione di latte crudo è stato accertato con una

(1) KRISTENSEN: *Annal. de Méd.*, 1929, vol. XXVI, n. 4, pag. 339.
(2) KLING: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1928, pag. 1401 e 1929, pag. 412.

grandissima regolarità. Non sono mai stati constatati focolai epidemici, anzi al contrario i casi si sono sempre verificati sporadicamente e non si è mai constatato anche qui più di un caso per famiglia. Non è mai stato messo in evidenza il contagio per mezzo delle capre, le quali sono rare in queste regioni nè sono colpite da melitococcia. Kling riferisce di un contagio di laboratorio avvenuto con uno stipite isolato dai bovini; è questo forse l'unico caso sicuro d'infezione di laboratorio con stipiti bovini, infezione che è sempre stata negata e la cui mancanza fu uno dei criteri fondamentali per negare la patogenicità del bacillo di Bang per l'uomo.

Quanto è stato riscontrato in Svezia è in perfetto accordo con le osservazioni che sono state compiute in Danimarca. Anche in Svezia i dati sono stati raccolti con grande scrupolosità e sono preziosi. Anche in Svezia va rilevato (e ciò, come vedremo fra poco, ha grandissima importanza) che il germe che è causa dell'infezione, si rivela sempre scarsamente dotato di potere aggressivo: non focolai epidemici, soltanto casi sporadici e in numero relativamente limitato nonostante la notevolissima diffusione della infezione fra il bestiame bovino.

Olanda. — Anche qui, dopo la descrizione di un caso dubbio fatta da Van der Hoeden nel 1927, sono stati esaminati sistematicamente riguardo al potere agglutinante verso il Br. abortus i sieri inviati al laboratorio centrale d'Igiene dello Stato per gli opportuni esami siero-diagnostici (Widal, Wassermann); si poterono così trovare 14 sieri che davano agglutinazione positiva (Jitta) (1). Tali sieri provenivano da ammalati in ognuno dei quali fu potuto esattamente stabilire la causa infettante: in 9 il contagio era avvenuto per mezzo del latte di bovini infetti, in 4 (veterinari) direttamente per contatto con materiali abortivi. Anche qui non fu mai dato d'incontrare veri focolai epidemici e neppure più di un caso per famiglia. Nelle regioni ove i casi si sono verificati, esistono capre in numero assai scarso, di cui non si beve il latte; esse non sono state riscontrate infette, non sono mai state colpite da aborto e comunque la loro presenza non è in alcun rapporto con i casi di infezione fra i bovini.

Inghilterra. — In Inghilterra, salvo rarissimi casi di regola importati, la febbre ondulante non era conosciuta. L'attenzione che

(1) Jitta: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1929, n. 3, pag. 421.

si è manifestata intorno a questa malattia ha rivelato anche in questo paese la presenza di casi, che però sinora non sono molto frequenti. Fino al 1929 furono raccolti nello studio eseguito da Dalrymple-Champeys [1] per conto degli Uffici di Sanità Pubblica 14 casi sicuri di febbre ondulante: altri 2 sono stati resi noti dopo la pubblicazione di Dalrymple (Nightingale e Wilson, Bloxome e Davey). Sono dunque in tutto, fino ad oggi, 16 casi, in maggior parte dovuti a contagio bovino. Dalla relazione di Dalrymple, che è molto minuziosa, risulta che le capre in Inghilterra sono rare e che non sono state trovate infette da Brucella. Le inchieste provocate hanno anche stabilito che esiste in Inghilterra, e particolarmente in Irlanda, un'alta percentuale di bestiame bovino infetto. (Champeys-Buchanan). Le indagini per accertare l'infezione umana non sono state condotte così sistematicamente come in Danimarca e in Isvezia; ad ogni modo anche qui è stata messa in evidenza in maniera assoluta la possibilità di un contagio bovino, e la completa mancanza di rapporti fra questo e capre infette in taluni luoghi, o fra i casi di infezione umana e questi ultimi animali.

Con questa rassegna sulla epidemiologia generale della febbre ondulante non ho veramente preteso di tracciare un quadro completo delle condizioni attuali della diffusione della malattia; troppo vasto, ed in parte inutile, sarebbe stato il lavoro. Non mi soffermo quindi a considerare dettagliatamente quei casi di infezione sporadicamente segnalati in paesi in cui la febbre ondulante mai era stata segnalata prima di ora: in Svizzera ad es., in Polonia e in Ungheria, per non dire che dei casi più caratteristici. L'interesse che questa malattia ha destato nel mondo intero specie per quanto riguarda la possibilità del contagio bovino, ha spinto a ricercarla in tutti i paesi ove era segnalato l'aborto epizootico; ed è così che talvolta degli stati febbrili non precisamente diagnosticati si sono rivelati all'esame sierologico come casi di febbre ondulante, per moltissimi dei quali assai spesso è stato accertato il contagio bovino.

Queste constatazioni di casi sporadici di febbre ondulante nei paesi che prima ne sembravano immuni acquistano particolare importanza agli effetti della valutazione del potere patogeno del Br. abortus per l'uomo. Prima però di stabilirne il significato epidemiologico, è necessario esaminare nell'insieme quanto finora è stato osservato in riguardo al modo con cui la febbre ondulante si è mani-

(1) DALRYMPLE-CHAMPEYS: *Report of Public Health*, 1929, n. 56.

festata sia dove da tempo era nota, sia dove è apparsa negli ultimi anni, ed in ultimo vedere cosa si può dire circa le nuove fonti di contagio e la natura dell'agente causale.

Nessun dubbio che negli ultimi anni sia stato constatato un maggior numero di casi di febbre ondulante: le statistiche di tutti i paesi colpiti sono a tale riguardo molto eloquenti. Ma questo aumento è solo in parte reale, e debbono essere presi in considerazione due differenti fattori. In taluni paesi, come per es., in Algeria ed in Francia (costa mediterranea), ove la malattia da tempo è nota, controllata e oggetto di precise statistiche, si è assistito ad un graduale diffondersi, specie verso l'interno, o all'insorgere di nuovi focolai epidemici: alcune volte questi fatti sono stati potuti mettere molto precisamente in rapporto con spostamenti di greggi infetti, ecc. Il movimento che la guerra ha portato nel commercio del bestiame, le accresciute possibilità del trasporto di questo e del latte e dei latticini freschi nei tempi attuali, sono pure un coefficiente non trascurabile della diffusione della malattia: a Baku, ad es., è stato accertato che il manifestarsi di una epidemia era in rapporto con il commercio di latticini importati (Sdrodowski). Diffusione maggiore dunque della malattia per una maggior *mobilità* dei veicoli d'infezione. In secondo luogo non si deve dimenticare che da qualche tempo per parte dei medici di ogni paese si rivolge alla febbre ondulante una attenzione molto maggiore di quanto non si facesse in passato, e ciò non soltanto ove la febbre ondulante è più o meno nota e più o meno sospettabile. Oggi la si ricerca spesso quando una diagnosi non appare chiara, anche se nel luogo ove il caso sospetto si manifesta non c'è l'abitudine ad osservare questa malattia; inoltre i mezzi diagnostici batteriologici, e cioè la sierodiagnosi e l'emocultura, si praticano con facilità e sono entrati nell'uso comune. Tutto questo spiega come comunemente si dica che la febbre ondulante è in aumento e come effettivamente tale affermazione corrisponda alla realtà, sempre però che si tenga conto della maggior perfezione diagnostica attualmente raggiunta. Ma ciò che oggi sopratutto trattiene l'attenzione dei medici e degli epidemiologisti è la possibilità dimostrata di fonti di contagio finora sconosciute: i bovini sopratutto, ed i suini.

Quando sei anni fa furono segnalati i primi casi di contagio bovino, si era ben lontani dalle condizioni che sono venute a manifestarsi in questi ultimi tempi; non si attribuiva a questi altro valore che quello dell'eccezionalità nè si pensava che sarebbe stato ne-

cessario in un futuro molto prossimo considerare questa nuova forma di contagio alla stregua, per la sua importanza, di quella caprina ed ovina. Si pensò anzi da alcuni (Bastai, Cerruti, Vercellana, Zanzuccchi) che, non essendo l'aborto epizootico bovino contagioso per l'uomo in estesissime regioni, questi casi segnalati non fossero dovuti ad un potere patogeno esplicato dal bacillo di Bang, fino ad allora ritenuto innocuo, ma fossero dovuti invece al fatto che il Br. melitensis può essere abortigeno per la vacca come lo è per la pecora. A questa spiegazione, cui molti si opposero con serie obiezioni, faceva buon gioco il fatto che non si conoscevano dei precisi criteri differenziali fra il Br. melitensis e il Br. abortus; così che pareva buono o per lo meno utilizzabile quello della mancanza di questo ultimo di potere patogeno per l'uomo. Oggi le nostre cognizioni tanto sulla epidemiologia della febbre ondulante come sulla batteriologia dei brucella sono molto progredite ed è possibile sostenere la tesi della patogenecità del B. di Bang per l'uomo con dati molto precisi sia di ordine epidemiologico che di ordine strettamente batteriologico, che è necessario ora esaminare dettagliatamente.

Come si è già detto, i primi casi di contagio umano per mezzo dei bovini si manifestarono in luoghi ove la febbre ondulante era ben nota: Stati Uniti d'America, Italia. L'esistenza in questi paesi della febbre ondulante in forma endemica o epidemica trasmessa dalle capre e dalle pecore fece nascere il sospetto della possibilità di un passaggio del Br. melitensis nei bovini, nei quali può provocare l'aborto (Evans, Zanzucchi) e dai quali poteva a sua volta esser trasmesso all'uomo. Fu in sostanza ammesso un duplice tipo di aborto epizootico bovino; quello da Br. abortus, non contagioso, e quello da Br. melitensis, contagioso per l'uomo; e conseguentemente un unico tipo — almeno per quel che riguarda l'agente causale — di febbre ondulante: quello da Br. melitensis, da varie specie animali trasmesso. A questo modo di vedere si oppongono oggi parecchi precisi fatti.

Anzitutto la distribuzione e la diffusione acquistata dalla febbre ondulante di origine bovina. Essa si riscontra in luoghi ove non vi è concomitanza di casi di infezione trasmessi dalle capre non solo, ma ove spessissimo le capre non esistono neppure. Noi possediamo a questo proposito dati di una certezza assoluta: sono i casi di infezione umana osservati nell'Europa centrale e del nord: Germania, Austria, Svizzera, recentissimamente Ungheria, Polonia, Danimarca,

Svezia, Paesi Bassi. In questi paesi, per concorde parere di tutti gli osservatori, sono stati rilevati i seguenti fatti: 1° la febbre ondulante non era mai stata osservata prima d'ora; 2° non esiste alcun rapporto fra i casi d'infezione e la presenza di capre e di pecore; 3° questi animali, in quasi tutti questi paesi, sono molto rari; 4° non si è constatato mai rapporto tra aborto epizootico bovino e presenza di capre; 5° precise indagini compiute in Danimarca e in Svezia hanno dimostrato che le poche capre esistenti non sono infette con Brucella. Che cosa dimostrano questi accertamenti? Dimostrano all'evidenza che non intercorre alcuna relazione tra infezione di capre e di pecore (Br. melitensis) ed infezione dei bovini (Br. abortus) e degli uomini: non è quindi possibile ammettere, almeno nei paesi del nord, l'esistenza di un aborto bovino da Br. melitensis mentre ciò era agevole quando i casi di contagio di bovini si riscontravano solo nei luoghi ove già da tempo si sapeva esistere la febbre ondulante umana per infezione da capre. Visto impossibile sostenere il contagio di bovini in queste regioni con Br. melitensis per opera delle capre è stato sostenuto (Bastai e Vercellana) [1] che i casi di infezione nei paesi del nord e del centro d'Europa potrebbero essere causati da Br. melitensis importati per mezzo delle frutta o delle verdure provenienti dai paesi mediterranei, ove appunto è supponibile che il Br. melitensis possa venire in contatto ed inquinare queste derrate. Parecchie ragioni si oppongono a questo modo di vedere. Anzitutto le derrate che provengono dai paesi mediterranei non hanno larga diffusione nella campagna, ma sono consumate principalmente nelle città. Ora, al contrario, gli osservatori che si sono occupati della epidemiologia della febbre ondulante per i paesi del nord, hanno unanimemente constatato la maggior frequenza di casi nelle campagne tra i contadini e gli allevatori di bestiame. Inoltre sarebbe assai difficile spiegare come tutti i colpiti possano aver fatto uso di verdure o frutta infette e con queste essersi infettati mentre risulta bene evidente in quasi ognuno — su questo punto i dati epidemiologici sono di una chiarezza assoluta — l'uso del latte non bollito o il contatto diretto con animali colpiti da aborto; a meno di non voler ammettere una infezione dei bovini per mezzo degli erbaggi e delle frutta contaminate con Br. melitensis e provenienti dall'estero, la quale ipotesi non appare nemmeno degna di

---

(1) Bastai: *Münch. Med. Woch.*, 1927, 74, pag. 2141 e *Boll. Ist. Sieroterapico Milanese*, 1928 - Vercellana: *Giorn. di Clin. Med.*, 1928, Suppl. al fasc. 11.

essere prospettata. Ed inoltre queste della possibilità della infezione per mezzo delle frutta (si noti bene: perchè tutta la febbre ondulante del nord e centro Europa fosse diffusa con questo mezzo, occorrerebbe ammettere che in quei paesi si mangiasse ovunque frutta e verdura proveniente da luoghi infetti, il che è contrario, oltre che al buon senso, alle attuali condizioni degli scambi commerciali) non sono che parole: prima soltanto di avanzarla occorrerà intanto dimostrare che la frutta è veramente infetta, perchè non è possibile riuscire a comprendere come ciò possa avvenire comunemente e su larga scala se la frutta viene raccolta e spedita come in ogni paese la si raccoglie e la si spedisce. È stata prospettata l'ipotesi della diffusione in queste regioni del Br. melitensis, che poi avrebbe contagiato i bovini, per opera di qualche ammalato o portatore immigrato. Se così fosse, bisognerebbe ammettere che *tutto* l'aborto bovino della Danimarca, della Svezia, Paesi Bassi ecc. è causato dal Br. melitensis, perchè *tutto* questo aborto è capace di infettare l'uomo; bisognerebbe cioè ammettere che il Br. melitensis si sia del tutto e simultaneamente sostituito al Br. abortus. Ma tutto questo come ognuno vede, è estremamente artificioso.

Se queste ragioni non bastassero a dimostrare l'infondatezza della ipotesi di un aborto bovino da Br. melitensis ve ne sono altre ancora, e non meno valide.

Contrasta con la sopra enunciata ipotesi la simultaneità con cui la malattia si è rivelata nei vari paesi d'Europa. Che una malattia quale è la febbre ondulante, la cui trasmissione all'uomo è ben nota e legata a determinati e non numerosi veicoli, possa diffondersi ed irradiarsi dai centri nei quali essa domina endemicamente è più che naturale; ciò infatti avviene ed è dimostrato da quanto si verifica in Francia, in Algeria, in alcune regioni d'Italia, per non ricordare che gli esempi citati. Si tratta sempre però in questo caso o di un graduale spostamento del limite con cui si potevano delimitare le zone colpite da quelle indenni (regioni meridionali della Francia), oppure della comparsa di qualche nuovo focolaio epidemico o endemico legato a qualche spostamento di bestiame o alla fornitura di qualche partita di latte o latticini infetti (esempio di Baku). Ma da questo all'ammettere che nel breve volger di tempo di quattro o cinque anni il Br. melitensis si sia sparpagliato in tutto il continente europeo e nord-americano, si sia addirittura sostituito al Br. abortus in alcune regioni ed abbia di qui potuto disseminare il contagio all'uomo, il passo da compiere è veramente

troppo lungo. Senza contare che nessun dato di fatto giustificherebbe un tale modo d'interpretare l'epidemiologia della febbre ondulante: occorrerebbe ammettere spostamenti di gran numero di capi di bestiame dai paesi mediterranei verso il nord e il centro Europa, mentre se mai sono proprio questi paesi, fortissimi produttori, che importano bovini nei paesi mediterranei; occorrerebbe dimostrare l'infezione delle poche capre esistenti in quelle regioni, ed il loro rapporto con focolai di aborto epizootico bovino, mentre e l'una e l'altra di queste condizioni, per quanto accuratamente ricercate, son venute a fallire.

Ed inoltre un tal modo di giudicare sarebbe giustificato se veramente si trattasse di *focolai sparsi* e limitati a determinate zone; ma i fatti son ben diversi, poichè si tratta della possibilità di contagio manifestatasi su interi continenti. Se i focolai di infezione fossero sparsi o isolati, ciò molto verosimilmente potrebbe essere spiegato con l'ammettere che si sia creata una condizione che prima non esisteva, ossia che si sia formato un focolaio di aborto bovino mantenuto da un germe patogeno per l'uomo, come è il Br. melitensis, ed importato con un qualsiasi veicolo.

Esaminiamo invece quello che è stato constatato e prendiamo come esempio più dimostrativo la Danimarca. Qui non si tratta di focolai sparsi: l'intero territorio è colpito più o meno intensamente a seconda delle regioni. Sono, in ultima analisi, 2.500.000 di animali bovini che hanno la possibilità di contagiare l'uomo. Sarà dunque necessario ammettere che tutto l'aborto epizootico bovino della Danimarca è causato dal Br. melitensis anzichè dal Br. abortus? E come mai le capre della regione, ospiti per eccellenza di questo germe sono indenni e sono riuscite a salvarsi da una infezione così invadente? Quanto è detto per la Danimarca, vale naturalmente per tutti gli altri paesi del Nord e centro Europa, in cui l'epidemiologia ha dimostrato che i casi di contagio umano si verificano senza esclusioni ovunque aborto epizootico esista. Non si può dunque, esaminando i fatti con serenità, ritenere il contagio umano da bovini dovuto ad una diffusione tra i medesimi del Br. melitensis. È invece realmente il Br. abortus che esplica la sua azione patogena, e, come vedremo fra poco, con modalità che gli sono del tutto peculiari. Ciò che in parte ha valso a far negare la patogenicità del B. di Bang e a dover quindi ammettere un aborto bovino da Br. melitensis (cosa che ben inteso può benissimo succedere sporadicamente, ma che è impossibile per tutte le ragioni sopra esposte sostenere che avvenga

ora in interi paesi) solo responsabile della infezione umana, sta nell'aver troppo creduto che il contagio bovino rappresenti un fatto nuovo, venutosi da poco a creare, senza aver riflettuto che la novità consiste solo nella scoperta di un fatto che tutto fa ritenere si ripeta da moltissimo tempo. Si pensi che la grandissima maggioranza dei casi sono stati individuati solo perchè *sono stati cercati*: se in Danimarca, in Svezia, in Germania, in Svizzera, in Polonia, non si fosse provveduto sistematicamente alla prova di agglutinazione per il Br. abortus di moltissimi sieri in esame per la diagnosi di malattie infettive, chi sa ancora per quanto tempo non sarebbe stata riconosciuta questa forma di contagio? Segnalati gli stretti rapporti tra Br. melitensis e Br. abortus; enunciata, per qualche sporadica constatazione, la possibilità di un contagio per mezzo dei bovini, sono pullulate da ogni parte le ricerche e le osservazioni; i casi di infezione cercati sono stati trovati e la possibilità dapprima enunciata come un fatto eccezionale, è divenuta certezza ed il fatto eccezionale si è dimostrato invece assai frequente e verificabile più o meno ovunque l'aborto epizootico bovino esista. Ed inoltre: non sono forse frequenti le deposizioni di chi, infettatosi, asserisce che erano note da tempo delle «febbri» di natura oscura in coloro che avevano contatto con vacche colpite da aborto epizootico? Si pensi anche che i medici delle regioni europee nelle quali fino ad ora non si soleva verificare la febbre ondulante non avevano nessuna familiarità con questa malattia, nè erano abituati a valutarne la possibilità nei loro esami diagnostici; e ciò non è certo debole ragione per ammettere che la malattia fosse presente da lungo tempo anche dove da pochissimi anni si è cominciato a conoscerla.

Le ragioni esposte finora per le quali è necessario riconoscere al Br. abortus potere patogeno per l'uomo sono state varie altre volte sommariamente esposte (Favilli, Ponticaccia) [1]. Ma di un'altra fondamentale non può ora tacersi, e cioè dei caratteri speciali con cui l'infezione da bovini si presenta e si diffonde.

Ricordiamo anzitutto quali sono le caratteristiche epidemiologiche della febbre ondulante trasmessa dalle capre o dalle pecore nei paesi mediterranei, ossia della febbre ondulante da Br. melitensis. Sono queste:

1°) esistenza di zone in cui l'infezione è endemica, (per l'Ita-

---

[1] Favilli: *Boll. Ist. Sier. Mil.*, 1928, fasc. III; Ponticaccia: *Giorn. Clin. Med.*, 1928, suppl. al fasc. XI.

lia ad es., la Sicilia ed alcune parti della Toscana), e nelle quali ogni tanto esplode qualche focolaio propriamente epidemico;

2°) non rare, e constatate specialmente negli ultimi tempi, le manifestazioni a carattere epidemico in luoghi precedentemente indenni (Italia, Francia, Algeria, Tunisia);

3°) constatazione, generalmente assai rara, di casi sporadici autoctoni in luoghi indenni (talora nelle campagne, più spesso negli agglomerati cittadini);

4°) possibilità di contagio di persone alimentatesi anche una sola volta ed eccezionalmente con latte di capra crudo o con i suoi derivati freschi: in moltissimi casi questo fatto risulta chiaramente specialmente tra quelli che si verificano nelle città (casi di Parigi e di Baku), ed è dovuto magari all'arrivo ed alla distribuzione di latticini infetti.

Tutto questo insegna che il Br. melitensis è un germe assai contagiante e causa frequentemente epidemie per il forte potere patogeno di cui è dotato; ciò è a tutti noto, e non è neppure necessario di richiamare l'attenzione sulla facilità con cui avvengono, appunto per questo suo potere, le infezioni di laboratorio. Le caratteristiche epidemiologiche della febbre ondulante trasmessa dai bovini, ossia della febbre ondulante da Br. abortus sono ben differenti e degne della massima considerazione.

Nonostante la grande possibilità di contagio, la malattia colpisce sempre raramente l'uomo, e non ha nessuna tendenza a manifestarsi in forma di focolai epidemici. Basta riflettere per convincersene alla enorme diffusione che ha attualmente l'aborto epizootico tra i bovini, in netto contrasto con la scarsità di casi fra coloro che hanno contatto con questi animali. Se si eccettua quanto riferiscono Ficai e Alessandrini, che descrissero in un paese della Toscana un vero e proprio focolaio epidemico circoscritto [1] di febbre

[1] Tanto è eccezionale il fatto che il Br. abortus provochi epidemie che è stato avanzato il sospetto che nella epidemia descritta da Ficai e Alessandrini non si trattasse di infezione da Br. abortus. Di questa opinione è Kristensen (*Annales de Médecine,* 1929, vol. 26, n. 4, pag. 339) il quale così si esprime: « Aussi bien par leur apparition épidémique que par leur processus clinique, ces cas diffèrent tant de l'aspect de la fièvre ondulante d'origine bovine, observée dans les régions septentrionales de l'Europe et dans l'Amérique du nord, qu' il est douteux qu' il s'agisse d'infections par le même microbe ».

ondulante da contagio bovino (si trattava di 16 persone, sette delle quali di una stessa famiglia, che tutte ammalarono quasi contemporaneamente dopo 10 giorni dall'aver assistito all'aborto di una vacca) e le osservazioni di Giugni in Romagna e forse di qualche altro autore italiano, i casi segnalati sono ovunque sporadici. Anche a questo proposito sono preziosi i dati di Kristensen, per la precisione con cui furono rilevati. In Danimarca come è a tutti noto, l'allevamento del bestiame bovino è fiorentissimo: tanto che su un territorio assai limitato si contano circa 2.500.000 capi di bestiame. L'aborto vi arreca gravi danni. Orbene in Danimarca non è *mai* stato osservato un focolaio epidemico, non solo, ma neppure più di un caso per ogni famiglia. Questa constatazione che risulta così chiara dalle indagini compiute in Danimarca, può estendersi in tutti i paesi ove l'infezione da bovini è stata riscontrata; caratteristica e dimostrativa ugualmente è la casistica tedesca, svedese (1), olandese nonchè quella francese e spagnola. L'infezione umana da bovini non si presenta dunque di regola con l'esplodere di focolai epidemici ma soltanto con casi sporadici.

Un'altra caratteristica importante della infezione da Br. abortus è costituita dalla rarità della infezione stessa rispetto alla possibilità di contagio. Nonostante la sua grande diffusione (2) e la grande resistenza nell'ambiente, e nonostante che, come dice Magnusson, in alcune regioni della campagna, come accade in Svezia, quasi tutti gli uomini per ragioni del lavoro vengano in contatto con bacilli dell'aborto, pure il B. di Bang molto raramente si mostra patogeno per l'uomo. Astraendo infatti dalla casistica dell'Europa meridionale e dell'America ove è endemica la febbre ondulante da Br. melitensis e ove non sempre questo tipo d'infezione è nettamente separabile da quella causata dal Br. abortus, e tenendo conto solo di quanto si è verificato nei paesi del nord e centro Europa, si vede

---

(1) Secondo i recentissimi dati di Kling (*Off. Int. de l'Hyg. publ.*, 1929, n. 10), in Svezia negli ultimi tempi si è manifestata la tendenza allo stabilirsi di veri focolai endemici — 8 in tutto — all'infuori dei quali però si constatano tuttavia casi sporadici di contagio bovino.

(2) Secondo Magnusson (*Svensck Vet. Tidskr.*, 1928, 33, pag. 106) nel distretto di Malmö, in Svezia, il 40 % circa degli animali è infetto: Fenninger e Krupski (*Schweiz. Arch. f. Tierheilkunde*, 1923, 7) ritengono infette circa 1/5 delle vacche svizzere; in Inghilterra (Dalrymple-Champeys: *Report of Pubblic Health*, 1929, n. 56) non vi sono ancora statistiche precise, ma già i dati raccolti dimostrano che l'aborto è diffusissimo. Lo stesso può dirsi per la Germania, l'Austria e l'Ungheria.

che la percentuale di casi d'infezione è molto bassa rispetto al numero delle persone che si sono esposte al contagio (Spengler); il che, assieme alla constatazione della mancanza di focolai epidemici, depone ancora a favore della poca virulenza del Br. abortus per l'uomo.

Vi è poi da prendere in considerazione il fatto su cui alcuni AA. (Spengler) insistono, della necessità di una azione prolungata e in dosi abbondanti del Br. abortus perchè l'infezione avvenga: ciò risulta da precise constatazioni fatte su persone che si sono alimentate solo accidentalmente e non d'abitudine con latte infetto e non hanno contratto l'infezione. A questo è però da obiettare che spesso il contagio avviene per contatto diretto, in veterinari cioè ed in macellai che maneggiano anche per una sola volta materiali abortivi.

Altro importantissimo dato che attesta la poca virulenza del Br. abortus è costituito dal fatto che è assai facile riscontrare uno stato di infezione latente in chi spesso viene a contatto col Br. abortus (Kling, Kristensen, Spengler). Esaminando un grande numero di sieri umani è stato possibile di mettere in evidenza una non trascurabile percentuale dotata di netto potere agglutinante per il Br. abortus, senza peraltro che opportuni esami clinici successivamente compiuti potessero rivelare uno stato di malattia. Poichè ai titoli a cui l'agglutinazione avveniva non può parlarsi di agglutinazione aspecifica, occorre ammettere che in precedenza il Br. abortus è arrivato nell'organismo e vi ha provocato un'infezione senza malattia ed un conseguente stato di allergia. È anche da prendere in considerazione, dopo queste constatazioni, la possibilità che le infezioni da Br. abortus siano rare anche perchè allà poca infeziosità del germe si aggiunge uno stato di immunità acquisita provocata dalla frequente ingestione di latte infetto o dai frequenti contatti con materiali inquinati (nei contadini). Questa ipotesi parrà in contrasto con la necessità di una somministrazione prolungata di Br. abortus, cui più avanti si è fatto cenno, perchè l'infezione si manifesti; si può però rispondere:

1° che l'infezione avviene quando l'organismo non entra in istato di immunità;

2° che da alcuni si ritiene (Veilchenblau ed altri) che l'infezione si manifesti soltanto in individui a poteri di reazione non perfettamente normali;

3° che secondo alcune ricerche di Kristensen l'infezione umana

sarebbe causata da stipiti di Br. abortus più virulenti, che dimostrerebbero un'azione patogena per la vacca (1).

È molto opportuno riferire a questo proposito il pensiero di Lustig e Vernoni (2). Secondo essi uno stesso materiale infettante, in questo caso il latte, può in certe condizioni infettare, in altre vaccinare. Questa duplice proprietà, infettante e vaccinante, spetterebbe tanto al latte caprino infetto da Br. melitensis come a quello vaccino infetto da abortus: senonchè il latte di vacca infetto da abortus è nelle migliori condizioni per vaccinare sia per la minor virulenza del germe verso l'uomo, sia anche per la relativa rarità dei germi in esso contenuti. Tali osservazioni sono perfettamente giuste e spiegano da un lato la relativa eccezionalità della infezione umana in rapporto alle grandi possibilità di contagio, dall'altra il frequente reperto di sieri agglutinanti senza infezione apparente.

I fatti finora esposti dicono dunque chiaramente che il germe non è in grado di infettare ogni volta che viene a trovarsi nell'organismo umano. L'infezione è un fatto eccezionale, tanto è vero che nonostante le enormi possibilità di contagio i casi relativamente non sono numerosi e sono nella grande maggioranza sporadici. In accordo con questa affermazione possono essere interpretate le recenti osservazioni di Zanzucchi (3), il quale, dopo aver vaccinato con bacilli di Bang vivi e virulenti 2500 vaccine delle provincie di Parma e Reggio Emilia ha accertato che circa 3800 persone corsero il rischio di infettarsi, mentre i dati statistici non hanno rivelato nello stesso periodo di tempo un aumento di casi di febbre ondulante nelle due provincie. Non si può, come vuole il Zanzucchi, considerare questo rilievo come una nuova prova della innocuità del B. di Bang per l'uomo, poichè queste osservazioni non stanno affatto in contrasto con quanto naturalmente si verifica in Danimarca, Germania, Austria, ecc. Anche le osservazioni di Zanzucchi quindi non diminuiscono per nulla il valore dei dati epidemiologici ormai tanto

---

(1) Secondo le osservazioni di Messieri *(La Nuova Veterinaria,* 1928*)*, sarebbero patogeni per l'uomo soltanto i primi aborti bovini mentre i successivi non lo sarebbero per una progressiva svirulentazione del germe. Non risulta che una simile constatazione sia stata fatta altrove e varrebbe la pena che si facessero osservazioni in questo senso.

(2) Lustig e Vernoni: *La febbre ondulante* - Torino, Unione Tipografica Editrice Torinese, 1927.

(3) Zanzucchi: *Giorn. di Clin. Med.*, 1929, luglio, fasc. X.

largamente accertati, anzi con questi dimostrano la eccezionalità della infezione da bacillo di Bang.

In alcune regioni del nord Europa la malattia è molto più frequente, è vero, che in Germania e in Austria, ove pure esistono grandi allevamenti di bovini, ma ciò, anche senza ricorrere alla supposizione che esistano stipiti di abortus più virulenti per l'uomo che non altri, può essere spiegato quando si conosca che nei paesi del nord si fa specialmente nelle campagne largo uso di latte crudo (Madsen) (1).

Dal confronto della epidemiologia della febbre ondulante dei paesi mediterranei, trasmessa dalle capre, e di quella della febbre ondulante del centro e nord Europa trasmessa dai bovini, emergono delle differenze talmente sensibili che non è possibile riunire i due tipi d'infezione. La differenza epidemiologica indica chiaramente che esiste anche una differenza eziologica: e se questa ultima è stata negli ultimi anni con tanta assidua premura cercata, si può dire oggi che è stata messa in luce forse più dalla indagine epidemiologica che da quella batteriologica. Se la causa della infezione dei paesi del nord Europa fosse il Br. melitensis noi dovremmo veder riprodotto anche qui il tipo epidemiologico proprio del Br. melitensis: e sopratutto per la virulenza del germe dovremmo veder sorgere qua e là dei focolai infettivi e delle epidemie. Nel nord e centro Europa ciò è mancato completamente.

Secondo il Vercellana le differenze delle manifestazioni epidemiologiche del Br. melitensis e del Br. abortus non saranno sufficienti a dimostrare che le infezioni da bovini sono veramente sostenute dal Br. abortus poichè egli ha già obbiettato che questo germe, passando dall'ambiente suo ottimo che è la capra, nei bovini, si attenua a poco a poco nella sua virulenza. E ciò potrà anche essere, per quanto nessuno lo abbia mai dimostrato: ma le supposizioni e le ipotesi non sono sufficienti di fronte alla imponenza dei fatti.

Le due infezioni inoltre differiscono anche per un altro importantissimo carattere: esse non si presentano con la stessa frequenza nelle varie età e nei due sessi. Mentre la febbre ondulante colpisce forse prevalentemente la donna, l'infezione da abortus si manifesta più frequentemente nell'uomo. È vero che questo fatto potrebbe spiegarsi giustamente col dire che l'uomo è più soggetto a questa ultima infezione per ragioni del suo lavoro: ma resta però inconfuta-

(1) Madsen: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1930, n. 2.

bile un altro fatto e cioè che mentre si è soliti riscontrare la febbre ondulante anche nei bambini, questi sono invece quasi senza eccezione risparmiati dalla infezione di Br. abortus, specialmente in quelle regioni ove si fa un grande uso di latte anche non bollito (Kristensen, Kling, Jitta, Spengler).

I recenti dati epidemiologici dimostrano dunque per tutte le ragioni che siamo venuti enumerando che il Br. abortus è dotato di potere patogeno per l'uomo. Questo potere fu negato per tre principali ragioni:

1° fino a qualche anno fa per mancanza di casi di infezione umana in luoghi esenti da capre e da febbre ondulante;

2° per la mancanza di iniezioni di laboratorio, così frequenti invece col Br. melitensis;

3° per la mancata dimostrazione sperimentale del potere patogeno del Br. abortus per l'uomo.

Riguardo al primo di questi tre argomenti è facile trarre le conclusioni dopo quanto sopra è stato esposto sulla natura del contagio umano da bovini. È interessante però ora di vedere se le altre due obiezioni sono tuttavia valide.

Per ciò che riguarda le infezioni di laboratorio con Br. abortus esse paiono oggi sicuramente accertate. Secondo Spengler [1] oggi sono noti vari casi, e cioè quelli riportati da Kling, da Clark e Frei, senza contare i tre riferiti da Huddleson per i quali si possono avanzare giustificati sospetti poichè le infezioni si manifestarono in persone che ebbero anche occasione di maneggiare culture di melitensis. Il caso di Kling avvenne per infezione con una cultura di Br. abortus isolato dalla vacca; nei casi di Clark e Frei, due per ciascuno, è pure accertato che l'infezione avvenne con culture di Br. abortus. A giustificare la rarità delle infezioni di laboratorio varrà quanto siamo per dire a proposito della innocuità del bacillo di Bang quando sia iniettato all'uomo: già da quanto si è detto finora apparirà chiaro che il bacillo di Bang non può, a causa del suo scarso potere patogeno, essere frequente causa di infezione di laboratorio.

Per ciò che riguarda la dimostrazione sperimentale del potere patogeno del bacillo di Bang per l'uomo — questione questa da gran

---

[1] SPENGLER: *Die Bangsche Krankheit beim Menschen*; 1929, Wien, Urban und Schwarzenberg.

tempo discussa — occorre dire subito che i vari tentativi fatti hanno sortito esito negativo. Non staremo ad elencarli tutti nè a riferirne dettagliatamente. La prima esperienza del genere è quella eseguita da Nicolle, Burnet, Conseil; esperienza ormai celebre per la notorietà che ha avuto e per l'uso che più o meno giustificatamente si è fatto dei risultati. Risultati, ripetiamo, pienamente negativi e come questi negativi quelli più recentemente riferiti. Questi esperimenti, compiuti sull'uomo non senza grave rischio, vanno ricordati insieme ai tentativi ripetuti di provocare l'infezione in scimmie di varie specie. Si è tentato (Vercellana) [1] di virulentare ma senza risultato il Br. abortus per mezzo del passaggio nella capra. Anche i risultati di queste prove non sono stati dissimili ai primi: come interpretarli? Non esitiamo a ripetere quanto già varie altre volte abbiamo sostenuto: che cioè da un tal genere di esperienze, condotte con un germe come il Br. abortus, questi risultati non devono destare meraviglia. È forse dubbio che il Br. abortus sia dotato di un potere patogeno di gran lunga inferiore al Br. melitensis? L'epidemiologia recente della febbre ondulante non lo dimostra forse chiaramente, e non ci dice che su un numero grandissimo di persone che si espongono al contagio, soltanto un numero proporzionalmente molto esiguo contrae l'infezione? E se questo è vero, come pretendere che il Br. abortus ogni volta che sia iniettato o fatto ingerire all'uomo, gli dia malattia, se questo non avviene in natura? Troppo si esige da questo genere di esperimenti, e l'errore sta appunto nel non aver tenuto conto di ciò che l'epidemiologia rivela e nel voler pretendere che un germe che in natura è tanto poco patogeno per l'uomo, lo sia sempre e nello stesso grado del Br. melitensis (che è un germe straordinariamente virulento e contagiante) quando viene artificialmente introdotto nell'organismo umano.

Nel 1925, quando la casistica di infezioni da Br. abortus era molto sparuta, i risultati negativi e le esperienze sull'uomo potevano essere presi in seria considerazione e si potevano anche adattare le conclusioni della osservazione a quelle della esperienza prospettando una ipotesi che conciliasse queste a quelle. Era facile allora, con una casistica che si contava sulle dita, raccolta per caso fortuito soltanto in paesi ove l'aborto bovino e la febbre ondulante da capre concomitavano, negare al primo potere patogeno per l'uomo facendo sopratutto assegnamento nella già famosa esperienza di Nicolle, Bur-

[1] Vercellana: *Giorn. di Clin. Med.*, 1929, fasc. X.

net e Conseil; i dati epidemiologici e i risultati della esperienza andavano allora perfettamente d'accordo. Ma dal 1925 ad oggi l'epidemiologia della febbre ondulante è grandemente mutata: essa ha messo in luce dei fatti che cinque anni fa poteva sembrare azzardato supporre e che non possono essere distrutti nè diminuiti nel loro valore dal risultato di un esperimento. Il quale, fra l'altro, non sempre si è mostrato esente da gravi critiche per il modo con cui è stato condotto, e sempre è stato *male interpretato,* nel senso che se ne è atteso quello che necessariamente non poteva dare. È giusto che coll'esperimento si cerchi di confermare o di spiegare una constatazione naturale, ma qualunque ne sia il risultato esso non dovrà mai servire a forzare l'evidenza della constatazione stessa con una interpretazione che la riavvicini al risultato della esperienza. Proprio in omaggio a questo principio informatore di ogni osservazione scientifica Burnet e Conseil (1), due di quei ricercatori che cinque anni fa con il loro esperimento crearono uno dei piedistalli della dottrina della innocuità del B. di Bang per l'uomo, hanno ritenuto doveroso di ritornare sui propri passi e di ripetere le esperienze. Dicono essi infatti:

« Quatre années ont passé sur ces expériences. Nous pouvons dire qu'elles ont vieilli.

« D'une part, si les faits restent, les connaissances nouvelles que nous avons acquises sur la fièvre ondulante et les Brucella peuvent modifier l'interprétation.

« D'autre part, depuis quatre ans, de nombreuses observations épidémiologiques ont changé la position du problème des rapports du melitensis et de l'abortus ».

Dopo aver riflettuto sulla logicità di alcune obiezioni che sono state poste ai loro esperimenti del 1925 e dopo aver passato in rapida rassegna le nuove osservazioni epidemiologiche (dal 1925 in poi) sulla febbre ondulante, Burnet e Conseil dicono:

« Il n'en est pas moins vrai que les travaux épidémiologiques des dernières années ont une importance considérable et posent en termes nouveaux la question des rapports du melitensis et de l'abortus. Dans ces conditions, nous avons éprouvé le besoin de reprendre nos anciennes expériences, en n'employant, melitensis ou abortus, que des

(1) Burnet et Conseil: B. melitensis e B. abortus. Leur pouvoir pathogène pour l'homme et le singe. *Arch. de l'Ist. Pasteur de Tunis,* 1929, vol. 18, n. 1, pag. 21.

souches tout récemment isolées ». E per queste esperienze sono stati usati: 5 stipiti di Br. abortus, isolati un mese prima; 2 stipiti di Br. melitensis isolati anch'essi circa un mese prima; e lo stipite abortus «Anna » di Ficai e Alessandrini isolato nel 1925 nell'epidemia di Arezzo. Sono stati infettati uomini, *volontariamente prestatisi,* e scimmie, con i seguenti risultati: su 3 uomini infettati con Br. abortus (200 milioni di germi sotto cute) in due si sono avute reazioni allergiche positive, in tutti e tre assai notevole produzione di agglutinine. Nelle scimmie inoculate con Br. abortus (30 e 10 milioni sotto cute) si è avuta in due su tre emocultura positiva e produzione notevole di agglutinine. Lo stipite « Anna » sulla scimmia si è comportato come l'aborto dai bovini, e poichè è nota l'estrema sensibilità delle scimmie per il melitensis Burnet e Conseil ammettono che « le microbe Anna isolé en Italie d'une fièvre ondulante humaine, est bien un abortus » e che « le microbe infectant de la vache origine ne serait pas un melitensis ». Ecco come Burnet e Conseil interpretano questi risultati.

« Le resultat global des expériences de 1928 est le même que celui des anciennes experiences. Mais si les sujets d'expérience n'ont pas présenté la maladie fébrile, ils ne sont pas restés indifférents à l'inoculation des abortus.

« Les réactions d'immunité marquent une différence importante à nos expériences de 1922-1923 et celles de 1928 ».

E quindi: « D'après les expériences nouvelles on ne peut pas affirmer que le pouvoir pathogène de l'abortus pour l'homme et le singe est nul. On peut affirmer que le pouvoir pathogène du melitensis est beaucoup plus grand que celui de l'abortus.

« Très instructif est le cas du singe III inoculé avec la souche « Anna »... Sur le Cynomolgus, cette souche s'est comportée comme un abortus. Nos conclusions sont donc moins cathégoriques que celles de 1923 ».

Burnet e Conseil hanno rilevato i fatti con una perfetta obiettività: ma poichè queste loro conclusioni « paraissent s'opposer aux « récentes observations épidémiologiques » si domandano: « y-at-il donc contradition entre l'expérimentation de laboratoire et l'epidémiologie? ». Ecco che cosa essi dicono:

« Les expériences obligent à examiner de près, avec un esprit critique aiguisé, les faits épidémiologiques... Les observations épidémiologiques s'étendent de jour en jour... On prévoit que dans une

question comme celle qui nous occupe, l'épidémiologie, s'enrichissant de plus en plus, puisse prendre les pas sur l'expérimentation ».

Nè Burnet e Conseil ritengono utile insistere nelle esperienze sull'uomo che porteranno sempre allo stesso resultato: essi con ammirevole logicità, indicano che in questo caso: « Pour avancer il faut, au lieu d'opposer l'observation à l'expérience, les associer l'une à l'autre, en réalisant et répétant dans un nombre de cas aussi grand que possible, l'expérience que nous n'avons pu faire qu'une fois: inoculer au singes inférieures les microbes retirés par hémoculture des cas humains de fièvre ondulante à abortus ». Esattamente: poichè la scimmia inferiore è pochissimo sensibile all'abortus, come già dimostrarono le esperienze di Fleischner, Vecki, Shaw, Meyer e quelle più recenti di Vercellana e Huddleson, e moltissimo invece al melitensis, molti risultati simili a quelli ottenuti coll'iniezione nella scimmia dello stipite « Anna » daranno la riprova inconfutabile che i germi isolati dall'uomo sono realmente degli abortus.

Così infatti in accordo con i dati epidemiologici vanno intesi i risultati degli esperimenti; ed a questa chiara e semplice comprensione dei fatti si può molto agevolmente arrivare se invece di ricorrere a certe contorsioni etiologiche come quella della duplicità causale dell'aborto bovino, si considera, come hanno fatto Burnet e Conseil e come da me da vario tempo è stato sostenuto che « melitensis et abortus apparaissent, de plus en plus, comme le même microbe, ayant déalisé des adaptations différentes. On doit réconnaitre que leur identité spécifique et la plasticité que l'espèce possède rendent vraisemblable l'existence d'abortus pathogènes pour l'homme ».

« Les souches qui, sans donner la maladie fèbrile typique ni au singe ni à l'homme, s'attachent aux tissus, produisant des agglutinines et créant un état allergique, ces souches marquent un tournant au dela duquel on entrevoit l'existence d'abortus pathogènes pour l'homme ».

Solo intendendo in tal modo i rapporti fra Br. melitensis e Br. abortus ed in tal modo associando ciò che l'epidemiologia dimostra con quello che ha dato l'esperimento, si può dare una più logica spiegazione dei fatti, in apparenza oscuri, che negli ultimi anni il contagio della febbre ondulante ha rivelato.

Trattando della epidemiologia della febbre ondulante non può tacersi dell'altra fonte di contagio che di recente è stata messa in luce: cioè della possibilità di un contagio dai suini colpiti da aborto epizootico. Questa possibilità non sembra per ora da prendere in

considerazione nel continente europeo, in quanto nella letteratura non si trovano descritti altro che con assoluta eccezione casi di questo tipo di infezione. In Italia ad es. non sembra siano noti altri casi all'infuori di quelli osservati da Zanardi in Romagna (1).

In Ungheria, ove l'aborto suino è assai diffuso, non è stato osservato fino ad ora, a quanto consta, alcun caso. Occorre però vigilare attentamente perchè niente porta ad escludere che anche in Europa l'aborto suino possa essere pericoloso per l'uomo come lo è in America. Negli Stati Uniti infatti, come già si è detto, i casi di infezione da suini si verificano con una certa frequenza, per quanto sempre molto minore che non quelli da aborto bovino. Le ragioni del minor contagio del resto sono ovvie, quando si pensi che manca qui la maggior sorgente di infezione, che è il latte, e l'assistenza agli animali in aborto non espone le persone così direttamente all'agente infettante come nel caso dell'aborto bovino. I casi di contagio si sono verificati con maggior frequenza tra il personale addetto ai mattatoi (Tagliaferro-Klark).

Passate così rapidamente in rassegna le varie fonti, vecchie e nuove, attraverso le quali l'agente patogeno della febbre ondulante può arrivare a contatto con l'organismo umano, una domanda viene spontanea: sono note *tutte* le sorgenti di contagio, oppure ve ne sono altre non conosciute? Si può dire con tutta sicurezza che altri veicoli di infezione devono esistere, se in ogni epidemia e in ogni resoconto statistico difficilmente manca una percentuale, per quanto piccola, di casi in cui non è possibile accertare il modo con cui la malattia è stata trasmessa; non alimentazione con latte o latticini sospetti, non contatto con animali che abbiano abortito. Sono state incolpate le verdure inquinate con orine di animali infetti, le frutta raccolte e provenienti da luoghi ove la febbre ondulante è endemica. Si è parlato spesso della possibilità di un contagio interumano: e questo, anche per qualche osservazione recente, sembrerebbe realmente potesse avvenire per quanto i casi imputabili al passaggio diretto dell'agente da uomo a uomo rappresentino sempre l'eccezione. Si è pensato alla possibilità che esistano portatori sani dell'agente causale, e che altri animali domestici oltre a quelli noti possano essere colpiti dalla infezione e trasmetterla all'uomo. Sono descritti infatti nella letteratura casi di infezione da Brucella riscontrati nel

(1) Zanardi: Soc. Med. Chir. della Romagna; in: *Rif. Med.*, 1927, n. 18, pag. 427.

cane, nella cavia, nel cavallo. Sono stati anche di recente compiuti studi per accertare se i polli possono essere infetti [1]; ma i risultati sono stati negativi. Si è ripetutamente parlato di trasmissione per opera di insetti (mosche, zanzare), e di diffusione della malattia per via idrica: questa ultima ipotesi avrebbe trovato negli ultimi tempi dei punti di appoggio degni di essere presi in considerazione. Secondo Aublant e Lisbonne un focolaio endemico da loro osservato in una piccola borgata non avrebbe trovato altra causa di contagio che l'acqua proveniente da pozzi molto superficiali, l'inquinamento dei quali è assai facile. Questo sospetto sarebbe confermato dal fatto che una borgata in identiche condizioni della prima, anch'essa con greggi di pecore infette, nella quale però l'acqua potabile è distribuita da una canalizzazione che la capta da lontano, è totalmente esente dalla febbre ondulante. Questa ipotesi sarebbe, sebbene indirettamente, assai convalidata delle osservazioni fatte in Isvezia circa la possibilità di trasmissione dell'aborto epizootico fra i bovini per via idrica. Kling [2] riferisce che in una determinata regione della Svezia è stato accuratamente studiato come l'aborto si diffonde tra i bovini: ed è stato visto che, su 54 cascine infette, soltanto 14 volte l'infezione vi è arrivata per mezzo di un animale già infetto, per quanto questo sia il modo di diffusione della malattia ritenuto più comune. Nelle altre 40 cascine non è stato possibile accertare per quale via l'infezione sia stata portata. Proseguendo nelle indagini è stato stabilito che il 78 % delle cascine colpite sono disposte nelle vicinanze immediate di un corso d'acqua, mentre che le cascine indenni sono nella proporzione dell'85 % lontane dai corsi d'acqua. In un certo numero di casi l'infezione delle varie cascine è avvenuta successivamente lungo un fiume secondo la direzione delle acque.

Anche questi dati, per quanto assai significativi, sono troppo imprecisi e non si può loro attribuire valore assoluto. Ciò che risulta chiaro da questi tentativi di ricerca di altre vie di contagio, è che le nostre cognizioni su questo punto della epidemiologia della febbre ondulante sono tutt'altro che complete. Altri modi d'infezione a noi sconosciuti debbono sicuramente esistere, ed è necessario che le indagini siano dappertutto e sollecitamente portate a risolvere anche questo problema che non è certo il più studiato di quanti oggi si agitano in tema di febbre ondulante, e che pure ha la sua importanza.

---

(1) Caliri: *Giornale di Batt. e Immunol.*, 1929, n. 12, pag. 941.
(2) Kling: *Off. Int. de l'Hyg. Publ.*, 1929, n. 10, pag. 1726.

Biologia dei batteri del gruppo brucella, agente della febbre ondulante nell'uomo e dell'aborto epizootico dei bovini, suini, ovini.

La scoperta della possibilità di infezione umana per opera del Br. abortus e della grande rassomiglianza fra Br. abortus e Br. melitensis, fece sorgere la necessità di approfondire le conoscenze sulla biologia dei due batteri, e di risolvere un problema che sopra a tutti si presentava importantissimo: quello della differenziazione dei due germi. Lo stabilire un criterio differenziale sicuro tra Br. abortus e Br. melitensis avrebbe permesso di risolvere in maniera inoppugnabile tutti i dubbi che la febbre ondulante ha fatto affacciare negli ultimi anni dal punto di vista etiologico. Impossibile, anche a questo punto, ricordare tutto quanto in questo campo è stato tentato o fatto: sono centinaia di lavori di ricercatori di tutto il mondo, che hanno portato all'argomento il loro contributo. Ma poichè in tutta questa mole di ricerche e di osservazioni incominciano a delinearsi alcuni dati assai precisi, mi limiterò a riassumere questi ultimi e a indicare che cosa l'indagine batteriologica suggerisce riguardo alla etiologia della febbre ondulante.

Differenziazione del Br. melitensis dal Br. abortus. — Essa è stata tentata con i mezzi più svariati, ed in riguardo alla morfologia, ai caratteri culturali, al potere patogeno verso gli animali, alle reazioni sierologiche, alle proprietà biochimiche in genere, alle attività metaboliche.

Quasi tutti gli Autori si accordano nel ritenere che non vi è differenza di caratteri morfologici fra i due germi. Per ambedue per lo meno sono state notate variazioni dalla forma abituale, nel senso che tanto l'uno che l'altro possono acquistare in determinate condizioni forma più o meno bacillare, o più o meno coccoide. Soltanto Trambusti [1] afferma che non ha mai visto il Br. melitensis acquistare forma così nettamente bacillare come il Br. abortus, e la Evans [2] ha ammesso che nella media il corpo batterico del Br. abortus è un po' più grande di quello del Br. melitensis. Ma questi dati sono troppo imprecisi ed inutilizzabili. Invece secondo le osser-

(1) Trambusti A.: *Rinnov. Medico*, 1925.

(2) Evans: *Journ. of Inf. Dis.*, 1918, vol. 22, pag. 850.

vazioni di Duncan (1) i diversi tipi di Brucella non mostrano differenze morfologiche quando provengono da culture sui comuni terreni, ma se questi germi vengono coltivati in terreni nutritivi molto ricchi, come il terreno di Fildes (2), il Br. abortus frequentemente assume aspetto nettamente bacillare, mentre il Br. melitensis e il paramelitensis mantengono la forma coccoide. Coltivando di nuovo su agar comune o glucosato il Br. abortus riprende la forma coccoide. I risultati di Duncan sembrano molto netti ed occorrerebbe confrontarli su un gran numero di stipiti e particolarmente sui Br. abortus isolati dall'uomo.

Riguardo ai caratteri e alle esigenze culturali si posseggono oggi dei dati assai precisi. Tralasciando le varie differenze di ricchezza di culture su vari mezzi, l'acquisto di pigmentazioni particolari in un tipo piuttosto che in un altro, caratteri questi ripetutamente contestati ed oggi non accettati da alcuno, è degno di rilievo il fatto che le esigenze culturali dei due batteri differiscono profondamente se invece di ceppi isolati da lungo tempo si osserva il comportamento dei germi appena prelevati da materiali infetti. Il Br. melitensis, sia esso isolato con la emocultura, o dal latte, o da qualsiasi altro materiale, è sempre perfettamente aerobio; cresce nei comuni terreni in presenza di ossigeno, o per lo meno in ambiente contenente la normale aria atmosferica. Il Br. abortus invece nella grande maggioranza dei casi non si isola in condizioni normali, perchè ha bisogno di una maggior concentrazione di CO_2 nel mezzo (Smith, Huddleson). Si ricorre perciò alla semina in tubi saldati alla fiamma, o si aggiunge CO_2 nella debita proporzione (5-10 % secondo Huddleson) all'aria contenuta in un recipiente chiuso in cui si pongono i tubi di cultura, oppure si pongono, sempre in un recipiente chiuso, insieme a quelle di abortus delle culture di b. subtilis che liberano in abbondanza CO_2.

Questi dati ampiamente accertati e controllati interessano a noi sopratutto per ciò che riguarda l'isolamento del germe dall'uomo infettato dai bovini: nonostante che non si abbiano ancora dati completi come sarebbe desiderabile, ne esistono già alcuni assai interessanti dovuti agli Autori americani e a Kristensen. Nei molti casi d'infezione umana osservati dai vari Autori americani,

---

(1) DUNCAN: *Trans. of. Roy. Soc. of. Trop. Med. and Hyg.*, 1928, vol. XXXII, pag. 269.

(2) FILDES: *Brit. Journ. of Exper. Path.*, 1920, fasc. 1, pag. 129.

in cui è stato possibile l'isolamento del germe mediante emocultura, non si fa cenno di speciali esigenze in rapporto alla percentuale di anidride carbonica: i germi isolati dall'uomo che si è contagiato dai bovini colpiti da aborto, non corrispondono sotto questo aspetto esattamente all'abortus che viene isolato dalla vacca. Vedremo in seguito per quali altri caratteri i così detti abortus umani americani si differenzino tanto dagli abortus bovini quanto dai Br. melitensis.

Assai differenti invece sono i reperti di Kristensen. Questo ricercatore ha isolato parecchie volte il Br. abortus con l'emocultura dagli ammalati, e dice che non gli è stato mai possibile di far l'isolamento aerobicamente. Egli dovette sempre servirsi del metodo proposto da Huddleson, che consiste nel tenere le culture in recipiente chiuso contenente il 10 % di CO_2. Sotto questo punto di vista, e di altri di cui diremo fra poco, Kristensen non ha potuto osservare alcuna differenza tra i ceppi isolati dall'uomo e quelli isolati dai bovini.

Circa gli stipiti isolati in Italia da persone contagiatesi dai bovini non abbiamo che dati frammentari: Ficai e Alessandrini riferiscono di aver isolato il loro stipite « Anna » in condizioni di semianaerobiosi. A Viviani (1), che isolò due ceppi, pare non sia stato necessario ricorrere alla anaerobiosi. Non esistono altri dati più precisi, ma siccome nessun autore fa cenno a particolari difficoltà per l'isolamento del germe mediante l'emocultura dall'ammalato, è verosimile, per quanto ne siano stati isolati molto pochi, che gli stipiti italiani si comportino da questo lato come gli stipiti americani, cioè possano isolarsi in condizioni di aerobiosi.

Il Br. abortus, come è noto, dopo un certo numero di trapianti si adatta facilmente a vivere in un ambiente che contenga l'aria atmosferica, e allora, per la maniera di accrescimento, non è più differenziabile dal Br. melitensis. Questo accostumarsi a nuove modalità di cultura è caratteristico di questo germe e l'abitudine a vivere nell'atmosfera normale avviene sempre facilmente, talora rapidamente. Il Br. abortus però, anche adattato alla vita perfettamente aerobia, come il melitensis, è sempre stimolato nel suo accrescimento da una atmosfera contenente il 10 % di CO_2 (Mc Alpine e Slanez) (2), la quale invece in questa proporzione inibisce lo sviluppo negli abortus di origine umana e porcina, e dei melitensi.

(1) Viviani: *Policlinico*, Sez. pratica, 1925.
(2) Mc Alpine and Slanez: *Jour of Infect. Dis.*, 1928, n. 3, pag. 232.

Già da Brotzu (1) fu notato che il Br. melitensis seminato in terreni alla Noguchi cresce con una pellicola al disotto dell'olio di vaselina, mentre il Br. abortus non la presenta affatto. Ciò molto probabilmente dipende dalla differente esigenza di ossigeno del Br. melitensis che è costretto in tale condizione a nascere in superficie.

Rispetto al potere patogeno verso gli animali si sa:

1° che la scimmia, come già si è visto, è molto meno sensibile alla infezione con Br. abortus che non alla infezione con Br. melitensis (Burnet e Conseil, e recentemente Huddleson) (2);

2° che la cavia è molto sensibile al Br. abortus, forse più che al Br. melitensis (Fleischner, Shaw, Meyer), ma che il Br. abortus perde poco a poco la sua virulenza sui terreni artificiali (Smith);

3° che il Br. abortus porcino è assai più virulento per la cavia del Br. abortus bovino e per la scimmia del Br. melitensis (Huddleson);

4° che gli stipiti isolati dall'uomo contagiatosi dai bovini rassomigliano, per virulenza, agli stipiti di Br. abortus porcino (Smith) (3).

Risulta inoltre dalle prove di Kristensen e Holm (4), che i ceppi di Br. abortus isolati dall'uomo in Danimarca hanno dimostrato uguale virulenza per la cavia a quelli isolati dai bovini.

Ho ricordato delle varie prove soltanto quelle più significative tralasciando le moltissime altre che sono state fatte. Esse però ci dicono già abbastanza, ma sono troppo frammentarie ed occorre estenderle. È necessario sopratutto vedere, giacchè la differenza di potere patogeno verso la scimmia è assai marcata, come si comportano verso questo animale i ceppi isolati dall'uomo: per ora prove in questo senso non sono state compiute che da Burnet e Conseil con lo stipite « Anna » di Ficai e Alessandrini, e da Huddleson, e in queste i germi sperimentati hanno rivelato un comportamento identico a quello dei Br. abortus di provenienza bovina. Molto ci potranno dire però anche le esperienze sulla cavia, se in accordo coi risultati di Smith si deve ammettere che i ceppi isolati di recente dall'uomo contagiato dai bovini dimostrano, quando siano inoculati in piccolissime dosi, una virulenza simile ai ceppi porcini e cioè

(1) Brotzu: *Boll. Sc. Med.*, 1927, Serie 10, vol. V, pag. 206.
(2) Huddleson: *Journ. of Infect. Dis.*, 1929, vol. 45, n. 4, pag. 293.
(3) Smith: *Journ. of Exp. Med.*, 1926, n. 2, pag. 207.
(4) Kristensen und Holm: *Centralbl. f. Bakt. O.*, 1929, Bd. 112, pag. 281.

maggiore di quella dei ceppi bovini. È necessario avvertire che da questo genere di prove sono da aspettarsi risultati convincenti solo a patto che si compiano esperienze sopra un gran numero di stipiti: su ciò insistono anche Burnet e Conseil.

Il campo delle reazioni immunitarie è stato forse il più sfruttato per cercarvi delle differenze fra abortus e melitense, ma è stato anche quello che ha dato minori risultati.

Alla maggioranza degli Autori gli esperimenti di agglutinazione e deviazione del complemento hanno fatto concludere che non è possibile di pervenire con questi mezzi a una differenziazione dell'un germe dall'altro. Alcuni sostengono ancora che si arriva con questi mezzi ad una differenziazione, altri hanno rilevato che sieri provenienti da individui infettatisi da bovini agglutinano a un titolo maggiore il Br. abortus che non il Br. melitensis, e fra questi è il Ceresoli (1) il quale afferma che l'agglutinazione è il mezzo più sicuro per la differenziazione della infezione da Br. Melitensis da quella di Br. Abortus. Questi reperti in genere non sono stati confermati, e si può dire che oggi giustamente si attribuisce loro poco valore. È stato sostenuto, ma non confermato, che i due germi sono dotati di potere antigene leggermente differente rispetto alle manifestazioni anafilattiche (Polettini) (2); sarebbe stato anche osservato che il sangue umano ha un potere battericida più forte per il Br. abortus che per il Br. melitensis (Ninni) (3). Ma, se dobbiamo stare alla realtà dei fatti, si deve dire che dalle reazioni immunitarie non si è potuto trarre un sicuro criterio differenziale, tanto che i batteriologi si sono sempre preoccupati di trovare mezzi più sicuri che non quelli serologici per identificare i due germi.

Numerosi sono stati i tentativi di classificazione serologica mediante il metodo di Castellani, nell'intento di vedere se era possibile di riunire in diversi gruppi i ceppi delle varie provenienze: ma per quanto questi metodi abbiano fornito qualche volta degli indizi interessanti, pure si può dire che in complesso essi hanno fallito lo scopo ed è mancato il risultato che se ne attendeva: ed ora, per quanto sia sempre attiva la ricerca dei criteri di differenziazione, e enorme il numero degli stipiti di cui taluni ricercatori dispongono, essa non è nemmeno più tentata per mezzo di queste

(1) Ceresoli: *La Clin. Med. It.*, 1929, pag. 219.
(2) Polettini: *Ann. d'Igiene*, 1924, n. 10, pag. 701; *Pathologica*, 1925, p. 241.
(3) Ninni: *Boll. Soc. It. di Microbiologia*, 1929, fasc. III, pag. 62.

prove. La ragione principale della poca attendibilità dei risultati sta nella discordanza cui le varie esperienze hanno condotto, e nella impossibilità da tutti rilevata di classificare un numero non indifferente di stipiti, che avrebbero potuto per le loro caratteristiche essere posti indifferentemente in un gruppo piuttosto che in un altro. Ciò nonostante dall'insieme di queste prove qualche cosa di interessante da trattenere è emerso. E sopratutto la assoluta identità, sotto questo aspetto, di alcuni stipiti isolati dall'uomo contagiatosi dai bovini, con autentici stipiti di Br. abortus bovini e porcini (Evans) (1). Duncan (2) inoltre ha constatato, ed i suoi reperti sono stati confermati da Orpen, che i germi isolati dall'uomo contagiatosi dai bovini in Rhodesia differiscono dal Br. melitensis, mentre sono strettamente ravvicinabili a stipiti di Br. abortus. La Evans in uno studio sulla distribuzione geografica dei gruppi serologici, trovò tra l'altro che in gruppi serologicamente affini i germi provenienti da regioni ove non si conosce altra causa della febbre ondulante all'infuori del contagio bovino, rientravano stipiti di provenienza bovina o porcina, ma anche umana; il che starebbe a dimostrare la esistenza di un certo rapporto tra gruppi serologici e distribuzione della malattia, ossia fra gruppi serologici e potere patogeno dei diversi stipiti. Ma a tutti questi dati non si può dare altro valore che di indizio e di orientamento, ed anche di conferma ad altri più precisi che oggi si posseggono: quelli cioè forniti dallo studio delle attività biochimiche e metaboliche di questi batteri.

I risultati delle prime osservazioni compiute in questo senso sono stati tali che è lecito affermare che solo da un ulteriore proseguimento di queste indagini è da aspettarsi la soluzione completa dei problemi che riguardano i rapporti tra Br. abortus e Br. melitensis. Questa è la vera strada da battere ora, anche perchè le proprietà biochimiche dei germi e i fenomeni del loro metabolismo ci danno criteri più precisi e più veri dal punto di vista biologico per stabilirne l'essenza e le relazioni. Le prime esperienze condotte in questo senso sono quelle di Brown, Duncan, Henry (3), i quali coltivando i Brucella in acqua peptonata con aggiunti i sali solubili di alcuni acidi organici (glicolico, fumarico), constatarono nel Br. abortus un più abbondante sviluppo, maggior produzione di

(1) Evans: *Amer. Journ. of Trop. Med.*, 1925, T. 5, pag. 419.
(2) Duncan: *Trans. of Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 1924, 18, p. 318.
(3) Brown, Duncan and Henry: *Journ. of. Hyg.*, vol. 23, pag. 1.

alcali e un maggior potere di decomposizione verso i sali medesimi. Queste ricerche però non hanno avuto troppa fortuna e meriterebbero di essere riprese su vasta scala non essendo state controllate da alcuno.

Vari ricercatori americani si sono occupati recentemente del metabolismo di questi batteri; è necessario riassumere qui sommariamente i risultati delle loro ricerche.

Huddleson e Abell (1), hanno studiato l'azione inibitrice del violetto di genziana e della tionina aggiunti ai terreni di cultura. Per il violetto di genziana essi hanno visto che questa sostanza, nelle proporzioni da 1 : 100.000 a 1 : 250.000 non turba la sviluppo dei melitensi e paramelitensi, mentre diluizioni minori sono capaci poi di inibire lo sviluppo degli abortus di provenienza bovina, umana o porcina. Queste tre varietà erano costituite da ceppi, alcuni dei quali erano nettamente inibiti dal violetto di genziana in diluizione da 1 : 50.000 a 1 : 100.000; altri invece a queste diluizioni non si sviluppavano affatto. La tionina, sperimentata pure da Huddleson e Abell, mostra invece di inibire lo sviluppo del Br. abortus di varietà bovina, ma non dei melitensi e degli abortus porcini. Queste ricerche sono state controllate in maniera molto sommaria e con un troppo esiguo numero di ceppi da Saitta (2) il quale, pure confermando la possibilità di una differenziazione, ha ottenuto risultati nettamente opposti. Kristensen e Holm hanno provato questo metodo di differenziazione su tutti i ceppi umani e bovini da loro isolati in Danimarca ed hanno visto che i ceppi umani e bovini si comportano in identico modo: tanto i primi che i secondi poterono svilupparsi discretamente in presenza di metilvioletto e furono ostacolati quasi completamente dalla tionina, mentre stipiti di melitense e aborto porcino erano inibiti dal metilvioletto e niente o poco dalla tionina. Questi risultati, che pure mostrano la possibilità di una differenziazione abbastanza precisa tra Br. melitense e Br. abortus, sono perfettamente opposti a quelli ottenuti da Huddleson, e sarebbero ravvicinabili a quelli per quanto molto incompleti di Saitta. Ad ogni modo la possibilità di una differenziazione con questo mezzo pare accertata, ed è necessario anche qui che le prove siano estese e ci si renda ragione dei risultati sconcordanti ma precisi, ottenuti da Huddleson e Abell da un lato e da Kristensen e Holm

(1) Huddleson and Abell: *Journ. of Infect. Dis.*, 1928, vol. 43, pag. 81.
(2) Saitta: *Giorn. di Batter. e Immunologia*, 1929, n. 4, pag. 307.

dall'altro; risultati che forse potrebbero mettersi in rapporto, secondo Huddleson, con differenze di alcalinità del mezzo.

Huddleson, Hasley, Torrey [1] hanno studiato il metabolismo dello zolfo da parte del Br. abortus, ed in seguito Huddleson ne ha applicato i risultati per differenziare i vari tipi di Brucella. Coltivando su agar-fegato, che contiene degli amminoacidi solforati, il Br. abortus sviluppa una certa quantità di idrogeno solforato, che può essere svelato mettendo nei tubi di cultura una cartina all'acetato di piombo. Viceversa, coltivando in ugual maniera gli stipiti di Br. melitensis e paramelitensis, la cartina all'acetato non annerisce, rivelando così che idrogeno solforato non si è formato. I vari tipi di Br. abortus si comportano in maniera un po' differente: secondo Huddleson i più forti produttori di H_2S sono i Br. porcini, vengono quindi gli abortus isolati dall'uomo e poi i bovini; i melitensi e i paramelitensi non danno H_2S, o ne danno traccie minime. Ciò che emerge d'importante da queste prove è che il Br. abortus isolato dall'uomo si differenzia nettamente dal Br. melitensis, mentre ha all'incirca le caratteristiche degli abortus di origine bovina e più marcate quelle degli stipiti porcini. Questo metodo di differenziazione nelle mani di Kristensen non avrebbe dato buoni risultati, in quanto dai suoi ceppi isolati tanto dall'uomo che dai bovini non avrebbe avuto sviluppo di H_2S; in altre esperienze aggiungendo direttamente l'acetato di piombo all'agar-fegato, Kristensen ha potuto invece osservare che gli stipiti in esame umani e bovini producevano H_2S e che non vi era differenza tra essi.

Per esperienza personale, compiuta su oltre 100 stipiti di Brucella delle diverse varietà, posso dire che veramente il criterio indicato da Huddleson e collaboratori è ottimo per differenziare il Br. abortus dal Br. melitensis. Il Br. abortus di provenienza bovina nella grandissima maggioranza dei casi produce in abbondanza H_2S, mentre il Br. melitensis di provenienza umana o caprina ne produce in minima quantità o non ne produce affatto. Nelle prove da me compiute i Br. abortus di provenienza suina sono H_2S produttori, ma mostrano comportamento più irregolare di quelli di provenienza bovina. Ho potuto saggiare sette stipiti di particolare interesse, isolati dall'uomo infettatosi dai bovini, e cioè quattro isolati in Germania e tre inviatimi dallo stesso Kristensen: questi ceppi umani si sono comportati come dei tipici Br. abortus, poichè tutti ed in

[1] Huddleson, Hasley, Torrey: *Journ. of Inf. Dis.*, 1928, v. 40, n. 2, p. 452.

breve tempo hanno annerito fortemente le cartine all'acetato. Questo reperto ha una considerevole importanza ai fini di stabilire la identità dei germi che sono stati causa della infezione umana nei paesi del nord Europa. In conclusione si può dire che lo studio del metabolismo dello zolfo nei batteri del gruppo Brucella è utilissimo per la differenziazione del Br. melitensis dal Br. abortus e che la sua applicazione porterà molto vantaggio alla conoscenza della parte che ciascun componente del gruppo Brucella ha nella etiologia della febbre ondulante.

Con ricerche molto dettagliate Mc Alpine e Slanez [1] si sono occupati di stabilire l'utilizzazione di glucosio nei terreni di cultura. In adatti terreni e con appropriata tecnica, fu stabilito che gli abortus di origine bovina utilizzano una quantità relativamente scarsa di glucosio, non più del 2 %; quelli di origine porcina e umana invece, e i melitensi, ne utilizzano una quantità assai maggiore, dal 5 al 20 %. Negli stessi terreni inoltre si ebbero differenze di comportamento fra i vari stipiti in rapporto del metabolismo dell'azoto non proteico e dell'ammoniaca: gli abortus bovini dettero una diminuzione del primo e una forte produzione di NH^3 libera, gli abortus porcini, umani e i melitensi un lieve aumento dell'azoto non proteico e debole produzione di NH^3. Questo metodo è stato applicato da Kristensen e Holm allo studio dei ceppi isolati dai bovini e dall'uomo in Danimarca: essi hanno trovato perfetta identità tra i ceppi umani e quelli bovini, netta differenza tra tutti questi stipiti e i melitensi e gli abortus suini, ed anche una netta differenza fra i ceppi danesi e quelli di Br. abortus isolati dall'uomo in America.

Non vanno dimenticate le ricerche di Valenti [2], compiute su un notevole numero di stipiti di varia provenienza. Egli ha stabilito che privando con adatta tecnica abortus e melitensis dei lipoidi legati al loro protoplasma, è possibile stabilire delle differenze fra questi e quelli in quanto gli abortus dopo la delipoidizzazione non flocculano se, emulsionati in soluzione fisiologica, sono esposti all'azione del calore, mentre i melitensi in maggioranza flocculano: ciò dimostrerebbe una differente struttura chimica dei due germi. Questi risultati, che non possono però essere applicati al differenziamento pratico dei due germi, hanno la loro importanza quando si

---

[1] Mc Alpine and Slanez: *Jour. of Inf. Dis.*, 1928, vol. 42, n. 1, pag. 66-73.
[2] Valenti: *Biochimica e terapia sperimentale*, 1927, pag. 77.

consideri il comportamento d'insieme degli abortus rispetto ai melitensi, invece di quello dei singoli ceppi: si vede allora che una differenza tra i due germi esiste, della quale all'atto pratico non può farsi uso perchè troppe sono le eccezioni e perchè esistono troppi punti di contatto attraverso i quali si passa insensibilmente da una varietà nell'altra. Analoghi risultati, interpretabili come questi di Valenti, ha avuto Favilli studiando il comportamento delle agglutinazioni aspecifiche in numerosi stipiti di Brucella delle diverse varietà (1).

Eperienze che non possono essere applicate alla rapida differenziazione del Br. abortus dal Br. melitensis, ma che dimostrano esistere sensibili differenze fra i due germi furono fatte da Favilli e Boncinelli (2) riguardo alla vitalità di questi batteri nelle comuni agar-culture: la vitalità del Br. abortus è molto maggiore di quella del Br. melitensis e paramelitensis, e va diminuendo in quegli stipiti che hanno più spiccate le caratteristiche di questa ultima varietà.

Questo in breve è ciò che di più positivo è stato fatto nell'intento di arrivare a distinguere i Br. melitensis dai Br. abortus: non ho ricordato tutto ciò — ed è moltissimo — che vi è di più incerto e che non ha ricevuto la necessaria sanzione dei controlli. Come si possono interpretare i risultati cui siamo giunti e che cosa essi ci suggeriscono sulla importanza che hanno i vari componenti il gruppo Brucella sulla epidemiologia della febbre ondulante? Si può affermare che i dati che oggi si posseggono sulla biologia dei Brucella sono sufficienti per confermare ciò che la epidemiologia già chiaramente ha dimostrato: che cioè le forme infettive provocate da contagio bovino sono realmente causate da germi identici, o molto rassomiglianti al Br. abortus tipo bovino; o comunque, se si vuol essere più precisi, che esse non sono causate da germi con le caratteristiche del Br. melitensis isolato dalle capre o dall'uomo che si è contagiato da questi animali. Come si è visto si posseggono oggi criteri sufficientemente esatti, per stabilire se un batterio del gruppo Brucella è un abortus oppure un melitensis: fra essi i più importanti sono quelli delle esigenze culturali dei germi in questione riguardo alla quota ottima di anidride carbonica per l'isolamento del ricambio dello zolfo, del comportamento di fronte a certe sostanze coloranti aggiunte ai terreni di cultura. Il ri-

(1) Favilli: *Boll. Ist. Sier. Mil.*, 1927, fasc. V.
(2) Favilli e Boncinelli: *Lo Sperimentale*, 1928, n. 5.

cambio dello zolfo, per es., dà di regola una differenziazione molto netta e, senza stare a sottilizzare troppo sul comportamento delle singole varietà, si può dire che i germi che noi intendiamo come melitensi (o paramelitensi) sviluppano minime quantità di H_2S, mentre gli abortus, siano essi bovini, umani o porcini, ne sviluppano in quantità più o meno notevole. Che risultati hanno dato questi metodi quando sono stati applicati allo studio degli stipiti isolati dall'uomo che ha contratto l'infezione dai bovini, di quegli stipiti insomma che sono considerati come Br. abortus? Non abbiamo per ora che i contributi di Huddleson, di Mc Alpine, di Duncan e di Kristensen. Dalle ricerche di Huddleson e Mc Alpine, che sono state sempre compiute su serie numerosissime di ceppi di varie provenienze, risulta concordemente che gli stipiti umani di Br. abortus differiscono per le loro attitudini metaboliche dai Br. abortus bovini, ma che differiscono anche dai Br. melitensi. Questi stipiti umani sono strettamente ravvicinabili ai Br. abortus porcini, e ciò coincide con quanto vario tempo fa ebbe ad osservare Smith riguardo al potere patogeno per la cavia dei Br. abortus umani. Ciò che forse colpisce di più è che questi germi, secondo le ricerche di Huddleson e secondo quanto io stesso ho potuto constatare su stipiti di Br. abortus anche di provenienza americana, sono fortemente produttori di H_2S; e questa proprietà, almeno da quanto oggi sappiamo, appare tanto caratteristica del Br. abortus, da fare ascrivere senz'altro fra questi quei Brucella che la presentano.

Non risulta invece, da quanto riferiscono gli autori americani, la necessità dell'isolamento del germe in ambiente semianaerobio, nei casi di infezione umana osservati in America; esigenza questa che è imprescindibile per il Br. abortus e che era invece ben spiccata nei ceppi studiati da Kristensen e da lui isolati da casi di infezione umana danesi. Questo ricercatore non ha mai potuto isolare dagli ammalati il germe se l'emocultura non veniva fatta in presenza di una quota del 10 % di anidride carbonica, come è appunto richiesto dal Br. abortus; esattamente come era necessario procedere per isolare il germe dai bovini. Le altre prove, particolarmente quella della utilizzazione del glucosio, hanno dato come già si è visto risultati tali — se si eccettua quella del metabolismo dello zolfo che ha dato risultati incerti — che Kristensen può concludere essere i ceppi isolati in Danimarca evidentissimamente dei Br. abortus e perfettamente differenziabili dai melitensi e dagli abortus porcini.

Dunque alle varie prove del metabolismo i Br. abortus umani

americani e danesi non si sono comportati ugualmente: occorre quindi dire che mentre gli stipiti danesi sono dei tipici Br. abortus bovini, quegli americani appaiono come abortus aberranti, ma in ogni caso non come dei melitensis. E questa in fondo è già una acquisizione di fondamentale importanza in favore della già evidentissima dimostrazione epidemiologica della patogenicità del Br. abortus per l'uomo.

Non vanno dimenticati gli studi compiuti sugli stipiti isolati da casi di infezione umana da bovini osservati in Rhodesia. Già da precedenti prove questi batteri si erano mostrati per le loro qualità serologiche come dei tipici abortus (Duncan) (1). Ulteriormente studiati, tali germi si sono mostrati fortemente H_2S produttori, hanno acquistato forme nettamente bacillari se coltivati su terreno di Fildes; non hanno richiesto per il loro isolamento una maggiore quantità di CO_2 come non la richiedono anche gli stipiti che si isolano dai bovini della Rhodesia. Gli stipiti rhodesiani umani e bovini si mostrano dunque perfettamente identici, si avvicinano per alcune caratteristiche agli stipiti americani e sono giustamente interpretati da Bevan (2) come rappresentanti di una varietà « locale » di Br. abortus, ossia come degli abortus anomali.

I dati sperimentali raccolti finora ci dicono già moltissimo: è veramente il Br. abortus, abbastanza bene individuato nelle sue proprietà biologiche, che, più o meno vicino al tipo « normale », è capace di infettare l'uomo. Occorre però fare ancora molto: i metodi di differenziazione indicati, che per quello che finora hanno dato sembrano preziosi, debbono essere controllati, elaborati, approfonditi; occorre estendere le prove con un numero più grande possibile di ceppi. Nulla sappiamo, ad es., delle capacità metaboliche dei germi isolati in Italia, in Francia, in Spagna, da ammalati infetti per contagio bovino: questa ricerca come facilmente si intende sarà di importanza grandissima data la concomitanza in queste terre della classica febbre ondulante da Br. melitensis. In ogni caso d'infezione che si presenta, in ogni animale in cui essa è accertata deve essere tentato l'isolamento del germe, e questo sottoposto alle prove per la sua identificazione: delle quali potremo valutare con fiducia i risultati quando questi siano il frutto di indagini condotte metodicamente e su larghissima scala.

---

(1) Duncan: *Trans. of Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 1924, 18, pag. 318.
(2) Bevan: *Trans. of Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, 1925, vol. 19.

RAPPORTI TRA BR. ABORTUS E BR. MELITENSIS E LORO CLASSIFACAZIONE.

Il riconoscimento delle strettissime analogie tra bacillo di Bang e bacillo melitensis portò alla unificazione di questi germi in un'unica specie: la specie Brucella melitensis, suddivisa in diverse varietà; la proprietà di questi germi di alcalinizzare i mezzi di cultura ha permesso ai batteriologi americani di classificare questi germi come « alcaligenes », tanto che il nome ufficialmente riconosciuto di questa specie batterica è « Brucella melitensis alcaligenes ». A me sembra che questa denominazione dal punto di vista puramente sistematico non sia esente da critica. È più che giusto di raccogliere sotto l'unica denominazione di Brucella tanto l'abortus che il melitensis con le loro relative varietà: ma la denominazione alcaligenes dà particolare rilievo a una caratteristica che non è spiccata nè la più importante di questi batteri. Inoltre volendo prendere questo della alcalinizzazione di mezzi culturali come criterio sistematico, si è stati costretti a ravvicinare i Brucella a germi che manifestamente non hanno con essi nessuna affinità: così nella classificazione proposta dagli Americani (1) e da molti accettata i Brucella figurano raggruppati insieme al B. Faecalis alcaligenes, germe che coi Brucella non ha assolutamente alcun rapporto. Ora, poichè tutti sanno che la sistematica dei batteri come degli esseri viventi in genere per quanto necessaria è sempre forzatamente artificiosa, e che ciò dipende dal dovere utilizzare quei caratteri che sembrano più evidenti e dal doverne magari trascurare altri che non sono noti, o di cui non si è in grado di valutare l'importanza, emerge la regola di sfruttare per le classificazioni il massimo numero dei caratteri apprezzabili e di ravvicinare i germi in gruppi più o meno affini a seconda del maggior numero di proprietà comuni che presentano i singoli individui. Per questo la denominazione alcaligenes del gruppo Brucella è del tutto impropria perchè utilizza una sola delle proprietà biologiche di questi germi, e che non è affatto predominante; ed obbliga inoltre a stabilirne una posizione evidentemente errata. Ho voluto segnalare i difetti di una tale denominazione e gli errori a cui essa porta prima che sia anche fra noi tacitamente accettata e se ne diffonda l'uso.

(1) WELDING: *Iowa State College*, 1927, vol. 1, n. 2.

Tutte le prove tentate per la differenziazione del Br. melitensis dal Br. abortus, ma più spiccatamente quelle sierologiche, hanno messo costantemente in evidenza dei fatti che sono di grande importanza: l'impossibilità di una classazione precisa di un certo numero di stipiti che possono indifferentemente essere posti in un gruppo o in un altro; il passaggio insensibile di una varietà nell'altra per l'attenuarsi graduale dei caratteri di una varietà e l'acquisto di quelli dell'altra; la facilità con cui taluni caratteri tipici possono essere perduti. Caratteristico a questo proposito il graduale adattamento del Br. abortus alla vita perfettamente aerobia, mentre appena isolato ha bisogno, per svilupparsi, di un ambiente ricco in CO_2. Questi indizi già sufficientemente dimostrano che Br. abortus e Br. melitensis e le altre varietà di questi tipi principali, non sono che esponenti di uno stesso germe che ci si presenta volta a volta con caratteristiche particolari, a seconda della sua diversa provenienza animale. Per dimostrare l'esattezza di questo modo d'intendere i rapporti fra Br. abortus e Br. melitensis sono state da Favilli compiute delle ricerche, che è necessario qui brevemente riassumere, e che successivamente sono state confermate da altri. Esse prendono fondamento dallo studio dell'agglutinabilità da siero e della agglutinabilità aspecifica da calore, da peptone, da acido lattico dei Brucella. Esaminando numerosi stipiti di Br. abortus, melitensis, paramelitensis da questo punto di vista, Favilli [1] ha osservato che non tutti gli stipiti di una delle tre varietà sono ugualmente sensibili alla agglutinazione specifica ed aspecifica, ma che ognuno ha una caratteristica sua propria differente da quella degli altri; ed inoltre che la sensibilità alle agglutinine specifiche è inversamente proporzionale alla agglutinabilità aspecifica, ossia, in altri termini, che i ceppi meglio agglutinati dal siero immune non sono aspecificamente agglutinabili. I paramelitensi sono tutti bene agglutinabili aspecificamente, i melitensi lo sono spesso più o meno, gli abortus lo sono soltanto eccezionalmente. Prendendo dunque come criterio di classificazione la agglutinazione aspecifica e la agglutinabilità da siero, è possibile formare con gli stipiti delle tre varietà una serie ad un estremo della quale sta il Br. abortus, all'altro il Br. paramelitensis; quello non termo-agglutinabile, quest'ultimo al massimo grado termo-agglutinabile e quasi insensibile all'azione del

---

(1) Favilli: *Lo Sperimentale,* 1926, fasc. IV, pag. 395; *Boll. Ist. Sieroterapico Milanese,* 1927, fasc. V.

siero immune. Tra questi due estremi si trovano i melitensi, con tutte le gradazioni intermedie di sensibilità alla agglutinazione specifica ed aspecifica. È stato poi possibile, e questo è il punto più importante, di poter far percorrere con stimoli molto semplici (azione del siero immune) ai vari batteri i diversi gradini della serie nella direzione abortus-paramelitensis, facendo loro acquistare delle caratteristiche che li avvicinano più o meno ai paramelitensis, ed è stato chiaramente dimostrato, a riprova dell'esattezza di queste osservazioni, che a parità di stimolo è più facile fare acquistare caratteristiche di paramelitensis a germi già leggermente aspecificamente agglutinabili, quindi più « vicini » ai paramelitensi, che non a germi perfettamente inagglutinabili. Queste esperienze oltre a dimostrare la impossibilità di stabilire, in specie con le agglutinazioni aspecifiche, dei netti criteri differenziali fra una varietà e l'altra, sono state utili sopra tutto a stabilire che le varietà della specie Brucella: abortus, melitensis, paramelitensis, sono date soltanto dalla differente « posizione » dello stesso germe nella serie, cioè dalla maggiore sua vicinanza al tipo abortus o al tipo paramelitensis, il quale ultimo rappresenta la forma atipica dei Brucella mentre l'abortus sarebbe il « tipo » di questi batteri.

Queste ricerche sono state confermate anche nei particolari da vari osservatori: Boncinelli (1), che ha operato le stesse modificazioni semplicemente con l'invecchiamento di brodo-culture, Lusena (2), De Antoni (3), Burnet (4). Quest'ultimo, con esperienze perfette, è pervenuto alle identiche conclusioni di Favilli, le quali gli permettono di adottarne lo schema proposto per la classificazione dei Brucella: abortus ⟶ melitensis ⟶ paramelitensis.

Se le conclusioni di questi esperimenti sono valutate tenendo contemporaneamente conto delle ultime acquisizioni della epidemiologia della febbre ondulante e dell'aborto epizootico, troviamo che le questioni connesse alla etiologia di queste malattie appaiono oggi molto semplificate e molto più chiare. I dati ricavati dallo studio della biologia dei Brucella e dalla epidemiologia si completano a vicenda: gli uni ci permettono di interpretare il significato esatto degli altri, ma occorre per arrivare a ciò di liberarsi da un pregiu-

(1) Boncinelli: *Boll. Ist. Sier. Mil.*, 1927, n. 5.
(2) Lusena: Ibid., 1929, fasc. 11.
(3) De Antoni: Ibid., 1928, fasc. 10.
(4) Burnet: *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1928, 17, pag. 128.

dizio che viene dal considerare melitensis e abortus, febbre ondulante e aborto epizootico con criteri che non appaiono più giusti alla stregua delle nuove acquisizioni. Bisogna desistere dall'abitudine di considerare questi due germi come entità distinte, dei quali soltanto il caso fortuito, o meglio una serie di casi, ci ha fatto conoscere le profonde analogie. L'esperienza e l'osservazione dei fatti naturali non ci insegnano questo: ci insegnano invece che tali batteri nelle varietà bovina, suina, melitense, paramelitense, non sono che le apparenze, la veste per così dire, che uno stesso germe volta a volta assume a seconda dell'ambiente cui è abituato. Si tratta sempre dello stesso microbio, plastico, adattabile, che comprende tipi con virulenza varia e variabile, come dicono Burnet e Conseil. Di questa plasticità diversi ed evidenti sono i segni: la graduale perdita di necessità anaerobiotiche, la possibilità di far variare l'agglutinabilità aspecifica con i vari mezzi, il potere patogeno che il Br. abortus manifesta soltanto in particolari condizioni per l'uomo. Quali sono dunque i rapporti fra Br. melitensis e Br. abortus, e che posto spetta loro nella patologia umana ed animale? Noi possiamo schematizzarli così.

I batteri che originano la febbre ondulante nell'uomo e l'aborto epizootico negli animali costituiscono una specie batterica, la cui denominazione può fissarsi in: Gen. Brucella, Sp. Brucella melitensis. Questa specie batterica è costituita da un microbo a larga adattabilità nelle varie specie animali, la permanenza nelle quali gli conferisce caratteristiche biologiche e proprietà patogene tali da permetterne la suddivisione in alcune varietà, che rappresentano soltanto una « posizione » mutevole e non obbligata del microbio stesso. I caratteri di queste varietà, dato che il batterio che le costituisce può facilmente spostarsi dall'una nell'altra, non sono fissi nè esattamente determinabili: tuttavia esse possono essere stabilite nella seguente maniera.

Br. melitensis, var. abortus. È il tipo primitivo della specie. Semianaerobio almeno nei primi tempi dall'isolamento. Metabolizza attivamente lo zolfo. Utilizza in minime quantità il glucosio. Non è agglutinabile aspecificamente, o lo è eccezionalmente. È abortigeno per gli animali, segnatamente per i bovini e i suini nei quali ultimi acquista caratteristiche (abortus tipo porcino) che lo fanno avvicinare alla varietà melitense. È scarsamente patogeno per l'uomo: la sua patogenicità per la specie umana è forse legata a condizioni locali, od individuali. Nell'uomo può assumere caratteristiche che

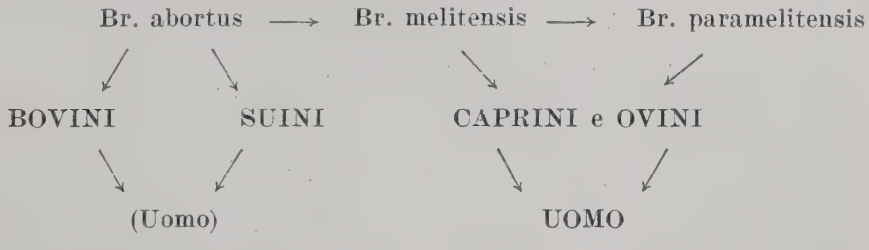
lo avvicinano al tipo suino (abortus tipo umano degli Autori Americani).

Br. melitensis, var. melitensis, o Br. melitensis propriamente detto. Aerobio. Non metabolizza lo zolfo. Utilizza il glucosio. Frequentemente aspecificamente agglutinabile. Ospite della capra e della pecora. Patogeno per l'uomo. Trapassa insensibilmente nella varietà Br. melitensis var. paramelitensis, costituita da batteri identici al melitensis, ma che posseggono al massimo la proprietà di essere aspecificamente agglutinabili e che hanno scarso potere antigene.

Lo schema abortus ⟶ melintensis ⟶ paramelitensis può quindi essere modificato nel seguente, che esprime il variare dei caratteri biologici col variare dello habitat animale e della patogenicità.

Massimo potere abortigeno Massimo potere febbrigeno

Minimo potere febbrigeno



Questo modo di valutare i vari problemi connessi alla eziologia e alla epidemiologia della febbre ondulante e dell'aborto epizootico è quello che meglio si adatta alle nostre conoscenze. L'unicità dell'agente eziologico, intesa con quelle condizioni imposte dalla constatazione dei fatti, che consentono la distinzione di varietà aventi diverse caratteristiche biologiche, diverso habitat negli animali e diverso potere patogeno, da ragione di parecchi fenomeni dei quali altrimenti sarebbe molto difficile trovare una spiegazione plausibile. (applausi).

Discussione.

Prof. Belfanti (Presidente). – Vi sono molte comunicazioni su questo argomento, ma io credo sia necessario che discutiamo la relazione del prof. Favilli direttamente. Apro perciò la discussione su questo interessantissimo problema così ben esposto ed impostato dal prof. Favilli. Dò quindi al prof. Bastai la facoltà di parlare.

Prof. Bastai. – Il relatore nella sua brillante relazione ha risposto esaurientemente ai tre problemi fondamentali che hanno agitato in questi ultimi anni il campo batteriologico e clinico in materia di febbre ondulante. Questi tre problemi a mio modo di vedere sono i seguenti: il primo riguarda l'individualità del bacillo di Bang e del bacillo di Bruce; il secondo riguarda i mezzi di indagine per potere differenziare l'uno dall'altro, il terzo, il più importante, riguarda la patogenicità o meno del bacillo di Bang nei riguardi dell'uomo.

Io sono molto lieto che il Prof. Favilli si sia oggi avvicinato completamente all'opinione che noi stessi abbiamo avuto occasione di sostenere, in confronto di vari altri studiosi, e fra questi lo stesso Prof. Favilli, che fino ad alcuni anni fa sosteneva o pareva sostenere che esistessero non già un bacillo di Bang e un bacillo Bruce, ma un'unica specie batterica, una brucella melitensis abortus universalis, o qualcosa di simile, responsabile e della febbre di Malta e dell'aborto epizootico. Su questo punto dunque noi non abbiamo nulla da eccepire a quanto il Prof. Favilli ha esposto nella sua relazione.

Il secondo punto riguarda i mezzi per distinguere l'uno dall'altro i due rappresentanti principali del gruppo delle brucelle. Io mi compiaccio vivamente delle comunicazioni, anche personali, che il Prof. Favilli ha fatto a questo riguardo, e mi auguro che questi risultati possano avere quel consenso universale che è necessario quando si debba risolvere una questione così complessa come è certamente questa della distinzione fra bacillo di Bang e bacillo di Bruce.

Una sola osservazione mi permetterei di fare, ed è questa: il gruppo delle Brucelle si comporta in modo veramente anarchico riguardo a tutti i mezzi che ci hanno servito per distinguere fra loro gli altri germi. Basterà ricordare che la reazione di agglutinazione non è specifica per il gruppo delle brucelle. È un fatto noto infatti che non solo l'agglutinazione non serve a distinguere fra loro le diverse varietà delle brucelle, come accade invece per altri gruppi di germi, ad es. il gruppo tifo-coli, ma non serve neanche a distinguerle da altri germi che evidentemente niente hanno a che fare con questo gruppo. Alludo in modo particolare alla infezione tularense che, come a tutti è noto, dà delle agglutinazioni evidentemente aspecifiche verso il gruppo delle brucelle, come a sua volta il gruppo delle brucelle, e gli animali e l'uomo affetti dalle malattie relative, provocano agglutinazioni altrettanto aspecifiche verso il bacillo tularense, non solo, ma verso anche altri germi. Ora, di fronte a un comportamento così anormale riguardante reazioni così sensibili, come quelle immunitorie, si rimane perplessi quando si debba assegnare un valore decisivo ad altre prove sotto molti aspetti certo meno sensibili e meno precise.

Comunque, sento che il prof. Favilli fa delle grandi riserve sulla possibilità di distinguere ancora questi due gremi in modo netto con mezzi per loro natura aspecifici, ed egli stesso attende i risultati di ulteriori studi; e certamente è da lodare questa sua grande prudenza.

E vengo al terzo punto, quello della patogenicità del bacillo di Bang verso l'uomo. Il prof. Favilli ha insistito molto sui dati epidemiologici più recenti

circa la comparsa di casi di febbre ondulante in paesi ritenuti indenni dalla malattia.

Come io ho avuto occasione di scrivere fin da due anni fa, questi casi rappresentano il fatto più importante che sia venuto in luce in questi ultimi tempi e parlano evidentemente in appoggio del concetto che il bacillo di Bang sia patogeno per l'uomo. Ma su questo punto sarebbe necessario che noi ci intendessimo un po' precisamente su quello che si vuol significare quando si dice che il bacillo di Bang è patogeno per l'uomo. Che il bacillo di Bang qualche volta, eccezionalmente, sia patogeno per l'uomo, è una cosa, sto per dire, ovvia, e farebbe quasi meraviglia se così non fosse. Anche altre infezioni che sono veramente proprie degli animali, qualche volta contagiano anche l'uomo. Ricorderò il mal rossino e l'afta, malattie che tutti ritengono proprie degli animali, e che qualche volta tuttavia contagiano l'uomo. Lo stesso dicasi per molte altre infezioni che sono proprie degli animali. Quindi, che meraviglia ci sarebbe se un germe così simile, così vicino al melitense, che è estremamente patogeno per l'uomo, sia qualche volta anche per l'uomo causa di contagio? Tra questo, e il dire, come ha detto qualcuno — non il Prof. Favilli — che tutti i casi derivati da contagio bovino siano da attribuirsi al bacillo di Bang, ci corre evidentemente un abisso. Se noi dovessimo arrivare ad una affermazione di questo genere, che cosa si dovrebbe dire per quel che riguarda l'Italia. Io sono convinto, e l'ho scritto già da vari anni e credo che molti clinici siano d'accordo con me che la importanza nella propagazione della febbre ondulante in Italia spetti non già alle capre, ma agli ovini e sopratutto ai bovini. Certamente in Piemonte, nella stessa Toscana, le vacche hanno un'importanza molto superiore a quella che non abbiano le capre. Finora ci siamo adattati a criteri di valutazione di questo genere: bastava che un saltimbanco fosse passato in un giorno di fiera a fare i suoi giuochi con una capra ammaestrata nella piazza del villaggio perchè per tutto un anno si fosse a posto per attribuire un'origine caprina agli eventuali casi di febbre ondulante che si fossero verificati nel vicinato. Ora non possiamo più accontentarci di questo, dal momento che è dimostrato, che è patente, che il contagio di origine bovina è relativamente frequente. È relativamente frequente in Toscana, più frequente certo in Piemonte, dove in questi ultimi anni, insieme col prof. Cerruti od altri, abbiamo osservato delle epidemie relativamente estese, per esempio a Vigone, a Scalenghe, ed in altri centri, posti vicino a Torino, in cui il contagio era sicuramente di origine bovina. In questi posti le capre sono rare, e la loro importanza è certamente secondaria.

Dunque, da noi, credo di non andar errato dicendo che il contagio da bovini è certamente molto frequente. Ora, tutti questi contagi saranno da bacillo di Bang o saranno invece da Melitense? Se ho ben capito, il prof. Favilli è di avviso che nei casi in cui vengono fuori queste epidemie così violente, o molto diffuse, si tratti sempre di melitense. Che differenza ci sarà con le altre? Ci sarebbero forse quelle tali differenze relative al metabolismo specialmente dello zolfo e alle agglutinazioni aspecifiche che servirebbero a distinguere li b. di Bang da quello di Bruce?

Bisognerebbe però, a parte le riserve che lo stesso Prof. Favilli si è imposto, procedere almeno a ricerche sistematiche nelle stesse regioni; e questo non è stato fatto. Per cui la più elementare prudenza consiglia di andare cauti in questa materia.

In fondo, l'argomento a cui si dà maggiore importanza, come lo stesso Favilli ha scritto recentemente, è questo: In Danimarca, in Austria, in Germania, ci sono molti casi di febbre ondulante. Siccome lassù non c'è febbre maltese, la malattia è dovuta al bacillo di Bang. Sarebbe come se noi dicessimo: fino a qualche tempo fa non erano conosciuti casi di infezione da bacillo di Bang, dunque si tratta di casi di febbre maltese. Nell'un caso come nell'altro è lo stesso sofisma. In realtà la presenza di casi di febbre ondulante in regioni ove prima non era conosciuta, sta a significare semplicemente questo: quivi esistono dei casi di febbre ondulante, e bisogna studiarne l'origine coi soliti criteri, nè più nè meno di quanto si fa per tutte le altre malattie infettive.

Io non riesco a capire come la supposizione che la febbre maltese possa essere stata propagata dalle nostre regioni verso le regioni nordiche, possa recare meraviglia. Sono infatti vari e infiniti i mezzi di trasporto del contagio. Ci si meraviglia forse quando viene il colera, nonostante le precauzioni di ogni genere che si oppongono alla sua propagazione, mentre nulla è disposto contro la propagazione della melitense? Quindi a me non farebbe nessuna meraviglia che la malattia si fosse propagata dalle rive del Mediterraneo verso le regioni nordiche. Non dico di averne la dimostrazione in mano, ma è assolutamente innegabile che è perfettamente verosimile che il bacillo melitense possa esservi stato importato dai nostri paesi.

Senza dire, che a giudizio di Madsen e Christensen in Danimarca, ad es. probabilmente la febbre ondulante è sempre esistita. Nel qual caso nulla vieterebbe di pensare che qui sia sempre esistito un focolaio ignorato di febbre melitense vera e propria.

Veniamo ora a parlare dell'ultima parte, che è la più importante, quella relativa ai tentativi di provocare sperimentalmente nell'uomo stesso la febbre ondulante mediante la inoculazione di bacilli di Bang. Fino a tre mesi fa, al dicembre scorso tutte queste esperienze erano riuscite negative. Tutte le volte che si è iniettato il bacillo di Bang nell'uomo — ed ormai si tratta di parecchie decine di casi — il risultato è sempre stato negativo. Oggi non si può più dire così, almeno in modo rigoroso. Il Dott. Otero, della Scuola Medica tropicale a Portorico, ha comunicato dei risultati che apparentemente porterebbero a concludere in senso positivo. Egli ha fatto delle esperienze nell'isola di Portorico.

Quivi fino a qualche anno fa non esisteva l'aborto epizootico. Recentemente si è sviluppata un'epidemia di aborto: egli si è recato sul posto munito di quei larghi mezzi di cui possono disporre gli americani (egli lavorava sotto gli auspici della Columbia University) ed ha cominciato intanto coll'indagare se esistevano dei casi di contagio umano spontaneo, e non ne ha trovato nessun caso; non solo, ma ha esaminato oltre cinquecento individui e praticato le relative agglutinazioni ed ha trovato che soltanto quattro o cinque su cinque-

cento presentano una reazione che arrivava ad 1 : 80, quindi del tutto insignificante in questo genere di infezione. Allora ha proceduto a delle esperienze: ha cioè somministrato nel latte pasteurizzato, a cinque individui, cinque diversi stipiti di abortus: alcuni coltivati nel paese, altri portati con sè dal laboratorio di igiene della scuola tropicale. Di questi cinque individui uno è ammalato; questo ammalato aveva ingerito un'agar-coltura di uno stipite di Bang che porta il n. 483, di origine porcina, proveniente dal laboratorio della Scuola di medicina tropicale. In seguito ha praticato queste altre due esperienze: ha somministrato bacilli di Bang a due individui fino a che il germe è diventato dimostrabile nelle feci. Ad uno ha somministrato anche il germe 483; all'altro un germe qualsiasi; anche questa volta l'individuo che ha avuto il germe 483 si è ammalato, l'altro no.

Queste sono dunque sette esperienze con due risultati positivi. In realtà però questi risultati sono contestabili, purchè si faccia una critica obbiettiva e serena.

Prima di tutto il germe N. 483 è di origine porcina, e sono ben note le grandi affinità tra le brucelle di origine caprina, ovina e porcina. In secondo luogo questo germe è stato somministrato due volte, e tutte e due le volte si è dimostrato patogeno; dunque non è un germe poco patogeno, come dovrebbe essere se fosse un Bang; è un germe molto patogeno, che darebbe cioè il 100 per 100 di mobilità, se si potessero fare delle percentuali sopra delle cifre così esigue. In terzo luogo, questo germe, inoculato nell'uomo, ha dato sì coltura positiva, ma l'agglutinazione in un caso è stata positiva soltanto in ritardo e a titolo basso, 1 a 100, e nel secondo caso è stata costantemente negativa. Io credo che questo dato sia sufficiente a far fortemente sospettare che si tratti di un paramelitensis, o per lo meno di uno dei germi che sta a limite tra il melitensis e il paramelitensis. Non dovrebbe essere in alcun modo un abortus; nè un para-abortus è dimostrabile, anzi, per ragioni teoriche, si dovrebbe ritenere che un para-abortus non possa esistere. In complesso, per le ragioni suesposte, è da ritenere che i risultati di queste ricerche non resistano alla critica, e non possono costituire una dimostrazione della patogenicità del B. di Bang per l'uomo, molto più quando si pensi a tutte le altre ricerche del genere riuscite costantemente negative.

Ed ora, prima di finire, io voglio fare a questo proposito una riserva che direi pregiudiziale; quando si è trattato di fare delle esperienze sull'uomo, si è in generale cercato di saggiare un numero di germi abbastanza grande e sempre diversi; e qualche volta si sono inoculate anche miscele di germi di varia provenienza. Ora non è così che si dovrebbe fare: se si vuole arrivare ad una conclusione sperimentale, e stabilire se l'abortus sia patogeno più o meno per l'uomo, è logico sperimentare con germi sicuramente non patogeni in condizioni naturali, ma inocularli in un numero grandissimo di uomini; allora soltanto si vedrebbe se veramente una percentuale piccola di individui ammala di febbre ondulante più o meno tipica. Se viceversa si comincia a prendere prima uno stipite, poi un'altro, e poi un altro ancora, certamente arriverà il momento in cui ci si imbatterà in uno di quei germi patogeni per l'uomo,

a proposito dei quali appunto si discute se siano bacilli della maltese e dell'aborto. Da questo punto di vista perciò non credo che le ricerche siano impostate bene: più logico sarebbe impostarle nel modo da me prospettato. Cosicchè se io debbo concludere su quanto sono venuto dicendo, sarei indotto a ritenere che la patogenecità del bacillo di Bang verso l'uomo si può ammettere in via eccezionale, ma nei casi in cui la malattia ha assunto una certa diffusione, come potrebbe essere per esempio in Danimarca, è per lo meno molto discutibile se sia in giuoco il Bang o il melitense vero e proprio, perchè, per il fatto di averlo trovato in qualche paese, sia pure esteso come la Danimarca, non toglie valore all'altro fatto, egualmente vero, che vi sono regioni estese dove sicuramente non esiste la febbre maltese, come oggi si può affermare, perchè non sono mancate le ricerche che ci hanno persuaso che le cose stanno realmente così. Ad esempio, in Inghilterra, dove la febbre maltese è conosciuta, la malattia costituisce un'eccezione estremamente rara. Del resto, anche da noi accade la stessa cosa. Noi siamo qui nel centro della Lombardia, che è uno dei paesi più colpiti dall'aborto epizootico, e qui la febbre maltese è una rarità. A Brescia è anche più rara. In Emilia, in questi ultimi anni, l'aborto si è diffuso largamente. Al contrario la febbre maltese è diminuita.

In complesso, riassumendo, ancora oggi si possono mantenere fermi i tre punti fondamentali sui quali, a mio avviso, come in questi ultimi anni ho avuto occasione ripetutamente di affermare, si basa il concetto della mancanza di potere patogeno, o quanto meno della estrema scarsezza di potere patogeno del bacillo di Bang verso l'uomo e cioè:

1) la mancanza o la estrema rarità del contagio umano da parte di vacche colpite da aborto epizootico nelle regioni più colpite dalla epizoozia, e dove la febbre ondulante o non esiste o è molto rara. Questo fatto resta vero ancora oggi, nonostante che in varie di queste regioni sia stata dimostrata la presenza di focolai di febbre ondulante, poichè non è men vero per questo che esistono tuttavia altre regioni dove appare manifesto l'andamento inverso delle due malattie;

2) la mancanza di contagi di laboratorio da parte del bacillo di Bang, poichè nessuno dei casi presunti tali resiste alla critica;

3) infine, la negativa dei risultati sperimentali delle inoculazioni del bacillo di Bang nell'uomo.

Al contrario, in questi ultimi anni si sono avute ulteriori indiscutibili conferme della possibilità di contagiare le vacche mediante la inoculazione del bacillo melitense e di provocarne l'aborto (Vercellana e Zanzucchi). Questo fatto fornisce una base sicura al concetto che io ho sempre sostenuto, della possibilità che una parte dell'aborto epizootico sia sostenuto dal bacillo melitense, e che conseguentemente possa derivarne il corrispondente contagio umano da bovini ad opera dello stesso bacillo della maltese, che con l'aborto epizootico genuino ha rapporti soltanto apparenti.

Prof. Belfanti. — Ringrazio il prof. Bastai per la sua interessante esposizione, e dò facoltà di parlare al Prof. Vercellana.

Prof. VERCELLANA. – Voglio semplicemente far noto che mi occupo da oltre cinque anni della questione del Bang e del Melitense e che ho scritto dei lavori che tendono a dimostrare che questi due microrganismi sono fra di loro differenziabili. Inoltre ho scritto dei lavori tendenti a dimostrare che il bacillo di Bang non è patogeno per il genere umano. Questi miei lavori hanno sollevato molte polemiche ed ora vedo con piacere che almeno un lato della questione sembra risolto nel senso che realmente il bacillo melitense pare differenziabile dal bacillo di Bang. A questo scopo, col Dott. Zanzucchi, avevo proposto una agglutinazione aspecifica all'acido lattico e che rientra fra le agglutinazioni aspecifiche proposte dal Burnet e dal Prof. Lusena.

Orbene, ho letto che il collega prof. Favilli è del parere che, sia pure prendendo in esame vari gruppi di stipiti, stipiti di Bang e di melitense, è possibile avere per lo meno un orientamento verso la differenziazione del paramelitense, del melitense e del bacillo di Bang. Ora, con la prova del metabolismo dello zolfo questa differenziazione sembra ormai un fatto compiuto. Per ciò che si riferisce al secondo punto della questione, e cioè alla azione patogena del bacillo di Bang, oppure alla mancanza di virulenza di detto germe pel genere umano, io ho eseguito degli esperimenti che hanno sempre dato risultati negativi; cioè a me non è stato mai possibile dimostrare che il bacillo di Bang abbia un'azione patogena per il genere umano. Inoltre io abito a Parma e nel parmense vi sono moltissimi casi di aborto epizootico; vi sono numerosissimi capi di bestiame colpiti dall'infezione da bacillo di Bang e, per quanto mi risulta, in questa regione non vi è un aumento nei casi di febbre ondulante nell'uomo. Presso a poco i casi di febbre ondulante, nonostante l'aumento dei casi di aborto epizootico, sono uguali a quelli degli anni precedenti. A proposito degli stipiti di supposto *bacillus abortus* di provenienza danese, io posso dire che uno di tali stipiti inviato dal Prof. Kristensen è stato sottoposto ad alcuni metodi di differenziazione, per esempio alla prova di agglutinazione coll'acido lattico, alla prova della termo-agglutinazione del Burnet. Orbene esso stipite di fronte a queste prove si è comportato nettamente come un melitense.

Recentemente inoltre mi è stato scritto dal dott. Ubertini della Stazione Sperimentale per le malattie infettive del bestiame di Brescia che, con un nuovo metodo di differenziazione da lui ideato, e che sarà fra poco reso di pubblica ragione, è stato possibile dimostrare che il suddetto ceppo inviato dal prof. Kristensen e isolato dall'uomo è un tipico melitense.

Adunque, gli esperimenti da me eseguiti e l'osservazione dei casi di aborto nelle vaccine e di febbre ondulante nell'uopo mi hanno finora dimostrato che il bacillo di Bang non è patogeno per l'uomo.

D'altra parte siccome è innegabile che nell'uomo possa capitare detto microrganismo, ritengo che il bac. di Bang per il genere umano si comporti come un saprofita abituale, per es. alla guisa del bac. coli.

Presidente. — La parola al Dott. F. Cantani.

Dott. CANTANI FRANCESCO. – A proposito della brillante e completa relazione del Prof. Favilli sul problema etiologico ed epidemiologico della febbre

ondulante, voglio richiamare l'attenzione sul fatto che in questi ultimi anni noi abbiamo avuto agio di osservare nell'Italia meridionale un numero sempre più grande di casi di febbre ondulante, sicchè l'impressione che questa febbre sia veramente in aumento è pienamente confermata il che giustificherebbe l'asserzione del Nicolle quando dice che la melitococcia è in via d'evoluzione e diventerà la malattia del futuro. In molte località della Campania nelle quali per moltissimo tempo non si è constatato alcun caso di melitense, si sono manifestati in questi ultimi anni varie diecine di casi e così in un paese di tremila abitanti in sei mesi soltanto si è superato il numero di cinquanta infermi per la maggior parte dei quali abbiamo avuto agio di controllare la diagnosi mediante l'agglutinazione e l'emocultura. Sull'etiologia di questi casi di febbre ondulante nelle nostre regioni, le ricerche istituite non hanno dato sempre un risultato molto chiaro: qualche volta erano in evidente rapporto con l'uso di latte di capra non bollito, talvolta, in località indenni per lungo tempo, i numerosi casi si sono verificati in coincidenza di epidemie di aborto nelle vacche in individui che avevano avuto contatti diretti od indiretti con gli animali infetti senza che si fosse potuto trattare verosimilmente di contagio attraverso alcuna altra via d'infezione.

Presidente. — La parola è al Prof. Cerruti.

Prof, CERRUTI. – Io desidererei chiedere al Prof. Favilli perchè egli ammetta così facilmente, seppure in via eccezionale, la duplice origine etiologica della febbre ondulante nell'uomo ed invece non parli affatto, e quasi neghi, la duplice origine etiologica dell'aborto contagioso nei bovini, a conforto della quale possediamo tanti dati epidemiologici e sperimentali. Vorrei chiedergli inoltre se ha rilevato come in tutti gli autori che hanno proposto un mezzo qualsiasi per differenziare il b. di Bang dal micrococco melitense si sia verificata una curiosa trasformazione nel loro modo di giudicare l'attendibilità di questi metodi mano a mano che ne estendevano l'applicazione ad un numero di stipiti sempre maggiore.

Tutti questi metodi di differenziazione sono stati escogitati per suffragare con qualche differenza di carattere biochimico, sierologico o culturale, la diversa origine degli stipiti in questione, per distinguere cioè anche con mezzi di laboratorio gli stipiti di Brucella provenienti dai bovini da quelli isolati nei caprini, nei suini, nell'uomo. In un primo tempo, quando il metodo era stato, diciamo così, lanciato, la corrispondenza tra l'origine reale degli stipiti e quella denunciata dalle prove di laboratorio parve un fatto quasi costante e servì a documentare la bontà del metodo. In seguito, aumentando il numero degli stipiti esaminati, questa correlazione andò via via diminuendo sino a scomparire del tutto. Ciò nonostante tutti questi autori hanno persistito nel sostenere la bontà dei propri metodi, negando però qualsiasi importanza alla correlazione dei dati forniti dai loro mezzi di classificazione con l'origine reale degli stipiti di Brucella. Tuttavia essi continuano a parlare di Brucelle di tipo umano, bovino, suino, pur sapendo che queste denominazioni hanno perso del tutto

il loro primitivo significato e non corrispondono affatto all'origine reale degli stipiti esaminati. Se noi leggiamo, ad esempio, l'ultimo lavoro di Huddleson sul potere patogeno delle Brucella per le scimmie, vediamo che di 7 stipiti catalogati come Br. suis in base al loro comportamento di fronte alla tionina, solo uno è effettivamente d'origine porcina, mentre gli altri sei sono d'origine umana. È vero che l'origine non ha soverchia influenza sulla classificazione degli stipiti quando si tratti di specie batteriche con caratteri stabili e sicuri (per quanto stamane abbiamo potuto apprendere come anche le specie microbiche più note e meglio definite possano, con relativa facilità, presentare fluttuazioni e mutazioni nei loro caratteri patognomonici), ma nel caso nostro la questione è diversa. L'origine degli stipiti venne scelta come punto di partenza dei vari tentativi di differenziazione, perchè dati epidemiologici e sperimentali avevano fatto pensare che alla diversità dell'origine corrispondesse un differente potere patogeno per varie specie animali e per l'uomo. Se si nega ora l'importanza dell'origine come termine di controllo delle classificazioni delle Brucella per mezzo dei vari metodi di laboratori proposti si toglie l'unico dato che permetteva di giudicare se tali classificazioni erano conformi ai dati forniti dall'epidemiologia, se il metodo cioè rispondeva allo scopo per il quale era stato proposto. Con ciò non voglio negare che lo studio del metabolismo dello zolfo, del glucosio, oppure quello dell'agglutinazione aspecifica e della batteriostasi non permetta di distinguere nel gruppo Brucella un certo numero di varietà, ma non credo opportuno che si debba designarle con i nomi di Brucella suina, bovina, umana, che istintivamente fanno pensare ad un'origine che non è quella reale, e ad un potere patogeno affatto arbitrario. Secondo le buone regole della nomenclatura sarebbe più esatto distinguere una Brucella tipo I, tipo II, tipo III, ecc.

Prof. Belfanti. – Il prof. Arnaudi deve riferire per parte del prof. Stazzi, il quale è spiacentissimo di non poter oggi intervenire e prender parte alla discussione, essendo stato chiamato a Roma di grande urgenza. Il prof. Stazzi spera però domattina di essere qui di ritorno, e forse partecipare al dibattito. Per intanto, prego il prof. Arnaudi di dare lettura della breve relazione che il prof. Stazzi ha inviato;

Nel Laboratorio e nella Stazione Sperimentale del R. I. Sup. di Med. Veterinaria di Milano vengono praticati numerosi esami diagnostici sul sangue di bovini appartenenti alle diverse stalle della pianura Padana e sospette d'infezione da bac. di Bang.

Le stalle prese in esame in quest'ultimo biennio ammontano a circa 400 e gli esami furono oltre 1500.

Da questi numerosi esami, per i quali la percentuale dei casi positivi è molto alta (oltre il 60%), nonchè dai rilievi epidemiologici e clinici, mi sono convinto della notevole diffusione di questa infezione, specialmente in certe zone attorno a Milano, a Cremona e a Pavia.

Quasi costantemente dal materiale inviato per le ricerche batteriologiche

(feti o loro parti, placenta fetale) si è potuto isolare il bacillo di Bang, che poi serve per la preparazione del vaccino vivo, oggi largamente richiesto dagli agricoltori stessi, dato i buoni risultati che in generale si ottengono.

I ceppi isolati in questi due anni nelle diverse località ove domina l'aborto epizootico dei bovini, sommano ora a 37 (dei quali due da organi di suini).

Ho richiesto più di una volta ai veterinari ed ai proprietari se in queste zone, che io chiamo « *località ad aborto enzootico* » si fossero mai manifestati casi di febbre ondulante nell'uomo, ma non sono riuscito ad assodare simile contingenza nemmeno nel personale addetto alle stalle, che beve di solito latte crudo e che pratica asportazioni di placente ed allontanamento di lochi infetti.

In Laboratorio poi, per quanto si lavori giornalmente e da lungo tempo intorno al bac. di Bang, sia a scopo diagnostico che per la preparazione dei vaccini e non siano mancati accidenti di laboratorio, ferite con materiale inquinato di bac. di Bang ed anche ingestione di prodotti culturali col pipettamento, non ho mai avuto a lamentare casi d'infezione nel personale.

Allorchè invece un mio Assistente, per ricerche comparative, intraprese degli studi sul bac. di Bang ed il micr. melitense, ebbe a contrarre la febbre ondulante, della quale era rimasto indenne durante tre anni di ricerche sul solo bac. di Bang.

Ad ogni modo poichè pare assodato, almeno dalle ricerche di molti AA. anche di altri paesi (sopratutto Tedeschi e Danesi), che l'infezione da bac. di Bang, quando si verifica nell'uomo. dipenda specialmente dagli interventi manuali per l'estrazione della placenta (la ritenzione della placenta è una delle complicanze costanti quando non è un sintomo precoce dell'aborto), io sconsiglio da tempo per misura prudenziale, tale pratica operativa e faccio limitare la cura della ritenzione della placenta alla applicazione, dopo alcune ore dal porto, di pomate o candelette antisettiche, che vengono immesse nella cavità uterina in un solo intervento, previa applicazione, secondo gli insegnamenti di una vecchia pratica, di grasso sulla mano e sul braccio dell'operatore allo scopo di proteggerlo da contaminazioni da parte dei vari germi delle infezioni uterine.

Presidente. — La parola al Prof. Zironi.

Prof. Zironi. – Dirò di una questione puramente teorica, in rapporto all'epidemia da bacillo di Bang. Io ed il collega Corpaci di questo Istituto abbiamo potuto dimostrare che l'inoculazione ripetuta di piccole dosi di bacillo di Bang alle cavie fa insorgere in questi animali una allergia così straordinariamente spiccata, che la inoculazione di una certa quantità di bacilli, perfettamente tollerata da cavie nuove, determina un'infezione rapidamente mortale. Se i bacilli uccisi vengono inoculati in quantità notevole, gli animali possono morire per effetto di una intossicazione rapidissima. Ora, quando si parla di potere patogeno per l'uomo del bacillo di Bang, o di un determinato stipite di questo bacillo, io mi domando se eventualmente anzichè parlare di modificazione del germe che ad esso conferiscono potere patogeno per l'uomo non si può parlare

di modificazione dell'ospite, del malato. Quando noi pensiamo che degli uomini possono ingerire ripetute volte del latte infetto, io e Bastai, che per il primo, applicando al caso singolo mie vedute teoriche, ha prospettato questo modo di vedere circa la febbre maltese, possiamo chiederci se eventualmente l'ingestione ripetuta del bacillo di Bang non faccia insorgere nell'uomo una allergia così straordinariamente spiccata, che in un determinato momento un'ulteriore ingestione dello stesso germe faccia scoppiare un'infezione che altrimenti non si sarebbe manifestata. È una questione che prospetto al collega Favilli, che ha raccolto tanti dati preziosi su questa malattia.

Vorrei inoltre riallacciare un poco la discussione di oggi alla discussione di questa mattina. Abbiamo avuto dall'interessantissima comunicazione della prof.ssa Morelli e da quella del dott. Boncinelli la dimostrazione che dei microrganismi possono subire in vitro delle modificazioni così straordinariamente profonde, che ci vuole tutta la buona volontà per riconoscere lo stesso identico germe nelle diverse fasi della sua vita. Il bacillo del tifo fermenta gli idrati di carbonio come il paratifo *b*, perde l'agglutinazione per siero anti-tifico, e diventa agglutinabile, col siero antiparatifico *b*:, eppure è sempre il bacillo del tifo. Non parliamo delle modificazioni morfologiche dello streptotrix che certamente si accompagnano anche a profonde variazioni biochimiche. Allora, io mi domando: se un germe può presentare di queste così profonde modificazioni rimanendo sè stesso, che cosa rappresentano le piccole differenze tra il bacillo di Bang e il bacillo della febbre Melitensis, tirate fuori, con difficoltà estrema, in tanti anni di lavoro, nello spazio di differenziare questi due tipi di microorganismi?

Presidente. — La parola al Prof. A. Cantani.

Prof. Cantani Arnaldo. – Prendo la parola solo in seguito a quanto ha detto il prof. Zironi il quale ha ricordato alcuni fatti che meritano di esser tenuti nella più alta considerazione nella discussione iniziata questa mattina.

In alcuni esperimenti, fatti nel mio Istituto da Francesco Cantani, avevamo notato come vi fosse qualche ceppo di Bang molto virulento per il coniglio nel mentre altri lo erano affatto; allo scopo di poter studiare un carattere differenziale, Francesco Cantani, per mezzo delle inoculazioni endocraniche nel coniglio, è riuscito con facilità a trasformare ceppi di Bang avirulenti in virulenti, ceppi di melitense avirulenti in virulenti nello stesso modo per i due presunti microorganismi. Egli ha notato ancora un altro fatto che penso abbia una certa importanza e che cioè questi ceppi virulentati per il coniglio non dimostravano per la cavia alcun aumento di patogenicità. Quindi, come ha notato il prof. Zironi, dobbiamo concludere che noi possiamo trasformare e modificare profondamente un microorganismo nelle sue caratteristiche e tenendo presente quanto ha comunicato il prof. Cerruti, non siamo autorizzati ad ammettere una duplicità dei due presunti germi, ma piuttosto una variazione di specie ritenendoli fondamentalmente unici.

Presidente. — La parola è al Prof. Micheli.

Prof. MICHELI. – Aggiungerò poche parole a quanto ha detto il prof. Bastai e voglio anzitutto compiacermi di avere assistito a questa importante discussione che è stata promossa dal nostro illustre presidente, Prof. Belfanti, sempre così benemerito del progresso degli studi in Italia. Debbo anche rallegrarmi col Prof. Favilli per la sua relazione, per quanto forse non sotto tutti i punti corrispondente alle nostre idee, perchè con essa il relatore ci ha dato un quadro molto diligente e molto completo dell'epidemiologia della febbre ondulante. Dicevo che, se non siamo perfettissimamente d'accordo con tutte le conclusioni della relazione del prof. Favilli, lo siamo in molta parte, perchè in realtà, il prof. Favilli ha oggi sostenuto che in fondo il bacillo di Bang è patogeno per l'uomo solo in via eccezionale. Il disaccordo verte soltanto sul limite del potere patogeno che per noi è meno ampio di quello che risulta dalle conclusioni del prof. Favilli, che si fonda essenzialmente su alcuni dati epidemiologici, dal momento che egli stesso ha riconosciuto che gli altri mezzi per differenziare le due varietà di Brucella, anche gli ultimi relativi alle varie esigenze culturali, al vario comportamento di fronte allo zucchero e di fronte agli aminoacidi solforati, devono essere ancora sottomessi ad un profondo controllo, prima di poter essere dichiarati dei caratteri differenziali stabili, fissi, delle due varietà batteriche. Egli cioè si è fondato essenzialmente su dati epidemiologici, riferendo con molta esattezza quanto è noto sinora sulla recente constatazione di casi di febbre ondulante da Brucella abortus, in Danimarca, in Olanda, in Germania.

Ora non c'è dubbio che i fatti corrispondono a quanto il prof. Favilli ci ha esposto; è soltanto l'interpretazione che può cambiare alquanto, specialmente là dove, come in Danimarca questi casi si sono andati moltiplicando. O perchè tanta differenza tra alcuni paesi dove l'aborto epizootico è endemico e ove i casi di febbre ondulante sono veramente eccezionali, ed altri paesi dove l'aborto epizootico è ugualmente endemico e di contagio umano sono abbastanza numerosi, come in Danimarca? Non è possibile che in Danimarca si tratti anzichè di aborto epizootico, di maltese di origine bovina? Il prof. Favilli ha preveduto queste obiezioni ed acutamente ha tentato di combatterle. Egli ha detto: noi ci fondiamo sovratutto sopra alcuni caratteri epidemiologici, poichè in Danimarca e in qualche altro posto, dove la febbre ondulante è relativamente frequente, essa non ha l'andamento epidemiologico che l'esperienza ha dimostrato essere proprio dell'infezione maltese; non procede a poussées come avviene nella febbre maltese, non si vedono quasi mai più casi di febbre ondulante nella stessa famiglia. Io però devo far notare che, in fondo queste osservazioni non hanno un valore assoluto, poichè ricordo che, a Torino per es., dove da qualche anno si sono avverate delle varie piccole epidemie di febbre maltese, d'origine sicuramente vaccina trasmesso alle vacche da capre infette, come fu dimostrato nella mia Clinica da Bastai e Cerruti, un tempo, e precisamente prima della guerra, come risulta dalle mie ricerche l'infezione maltese si manifestava solo in modo essenzialmente sporadico. E se è vero che a Torino si

sono avuti in questi ultimi anni casi di vari membri colpiti in una stessa famiglia, è altrettanto vero che questo costituisce l'eccezione. Anche nelle recenti epidemie era straordinariamente raro di trovare 2 ammalati nella stessa famiglia, per quanto soggetti alle stesse condizioni d'infezione. Quindi, questo carattere non ha, a parer mio, valore ed insinuo il dubbio che là dove la infezione da aborto bovino è trasmissibile con una certa facilità all'uomo, là si tratti di infezione maltese trasmessa dalla vacca all'uomo. Il prof. Favilli ha detto: in Danimarca, è risultato non esistere capre infette e nemmeno capre recettive. Ebbene, non è soltanto la capra che può infettare i bovini. Questi possono essere infettati da altri bovini, possono essere infettati dai porci, possono essere infettati dall'uomo stesso; per cui là dove l'epidemia ha assunto una certa estensione, bisogna ammettere essenzialmente, per analogia con quanto succede altrove, che si tratti di febbre maltese. Altrimenti poi si spiegherebbe la estrema rarità o l'assenza di questi casi là dove esista assai diffuso l'aborto epizootico. Nelle campagne del Biellese, per esempio, c'è l'aborto epizootico. In città, da molti anni l'ospedale è diretto dal Prof. Satta, il quale è un'osservatore ed esaminatore espertissimo e diligentissimo, anche dal punto di vista sierologico. Tutte le sierodiagnosi del Circondario fanno capo a Biella. Ebbene, il Prof. Satta mi assicurava che non ha mai trovato sieri umani che agglutinassero il maltese o il Bang. salvo due relativi a 2 malati provenienti da fuori e cioè dalla provincia di Torino, Ora, come è possibile un così diverso comportamento, se non ammettendo quello che noi ammettiamo, e cioè che il bacillo di Bang, se qualche volta è patogeno, in realtà lo è soltanto in via eccezionale? E in queste tesi ci confortano anche i dati sperimentali che il Prof. Vercellana, che è intervenuto nella discussione con molta competenza, ha qui esposto, onde risulta che finora — come lo stesso prof. Favilli ha riconosciuto — la dimostrazione sperimentale della non patogenicità del bacillo di Bang, per lo uomo non è stata raggiunta, mentre invece è notissimo come sia patogena la Brucella melitensis. Ultima osservazione: il prof. Favilli ha accennato ad alcuni casi d'infezione da laboratorio di persone che lavoravano con la Brucella abortus; certo, vi sono questi casi, li conosco anch'io. Ma non è detto che siano in rapporto con la Brucella abortus, perchè gli stessi operatori lavoravano anche con la melitensis, come nell'osservazione ricordata di recente da Luise Holl la quale, essendo assistente nell'Istituto d'Igiene dell'Università di Colonia, ove l'aborto epizootico è assai diffuso, non ha potuto riferire che un caso di febbre ondulante da bacillo di Bang, oltre al suo personale, molto discutibile. Concludendo noi siamo in fondo d'accordo col concetto sostenuto con tanta competenza dal prof. Favilli. La nostra formola è soltanto più restrittiva. La Brucella melitensis è fortemente patogena per l'uomo, la Brucella abortus, se lo è, solo in via eccezionale. E questa ha la sua importanza, facilmente comprensibile, agli effetti profilattici.

Presidente. — Il Prof. Favilli può rispondere, se crede, ai precedenti oratori.

Prof. Favilli. – Io debbo prima di tutto ringraziare tutti coloro che hanno voluto portare un contributo di osservazioni personali a questo argomento che è ancora dibattuto, e che mi hanno in tal modo voluto aiutare a risolvere la questione. Ma siccome molti hanno preso la parola, non so se riuscirò a ricordare tutto quanto è stato detto, e preferisco riassumere le principali obiezioni che mi sono state rivolte. Debbo innanzi tutto osservare che forse nell'esprimermi sono stato un po' più reciso di quanto in fondo non penso; ma questo è più un difetto di forma che di sostanza, ed è un difetto causato da necessità di fatto. Perchè è appunto per necessità di fatto che ho dovuto costantemente parlare di brucella abortus e di brucella melitensis, dell'uno non patogeno, dell'altro patogeno, come se effettivamente esistessero delle differenze così precise. In realtà questo modo che necessariamente ho dovuto tenere per esprimermi mi ha portato ad alterare il mio preciso pensiero, perchè sono proprio le differenze nette e precise che io nego ed escludo in questi germi, dopo ciò che dimostrano i dati epidemiologici ed i dati di laboratorio. Ho insistito molto infatti sulla necessità di considerare il germe che noi volta a volta chiamiamo Brucella abortus bovino, o umano, o suino, o Brucella melitense o paramelitense, come un germe unico, ma non nel senso in cui il prof. Bastai dice di intendere e di cui sembra rimproverarmi. Io non ammetto come mi fa dire il Prof. Bastai l'esistenza di un « Brucella abortus universale » che a un momento è patogeno per l'uomo, ad un altro per i bovini o per i suini che sia: ammetto teoricamente l'esistenza di un unico germe, il quale volta a volta, a seconda dell'ambiente in cui si trova (capra o bovini) acquista caratteristiche differenti; ciò è ben diverso da quanto il prof. Bastai dice che io penso, e sulla unicità intesa in questo senso insistito e sento di non dovermi muovere. Ma pure così pensando sono costretto a parlare di Brucella abortus o di Brucella melitensis, intendendo riferirmi con questa denominazione alla « posizione » — come io soglio dire — in cui in un dato momento lo stesso germe si trova. Nè d'altra parte io vedo quale altra via e quali altre denominazioni dovrei tenere per esprimermi. In sostanza io ammetto che questo germe esiste in natura in una scala infinita di gradazioni: quando si trova ad uno degli estremi di questa scala, cioè in « posizione » di melitensis, ha, assieme a determinate caratteristiche biologiche, il massimo potere patogeno per l'uomo; quando è all'altro estremo, acquista le caratteristiche biologiche dell'abortus e soltanto eccezionalmente è patogeno per l'uomo. Eccezionalmente quanto si voglia, ma talvolta lo è. Su ciò del resto anche il prof. Bastai ed il prof. Micheli sono d'accordo. Fra questi tipi estremi ammetto naturalmente tutta una gradazione di tipi intermedi per quanto riguarda il potere patogeno ed i caratteri biologici, per i quali ultimi mi riferisco particolarmente ai risultati delle mie ricerche. L'obbiezione principale che è stata mossa a questo mio modo di vedere è questa: che in Danimarca — ci si riferisce alla epidemiologia danese perchè io, soltanto per comodità di esemplificazione, ho richiamato massimamente su di essa l'attenzione — le infezioni umane da bovini sarebbero troppe rispetto a quello che dovrebbe incontrarsi dopo aver ammessa l'eccezionalità del potere patogeno dell'abortus per l'uomo. Ma cosa ci obbliga a pensare che il Brucella abor-

tus, debba manifestare soltanto eccezionalmente il suo potere patogeno per l'uomo e mantenere fisso proprio questo carattere, quando sappiamo che i Brucella sono dei germi a larga adattabilità, e capaci di assumere volta a volta differenti aspetti e proprietà? Perchè, quando è così logico considerare i vari tipi di Brucella come un unico germe in differenti posizioni, e con differenti caratteri, vogliamo che soltanto il carattere « patogenicità » rimanga fisso? Non ho nessuna difficoltà ad ammettere che il Br. abortus che ha provocato l'infezione umana in Danimarca si avvicini di più al tipo del Br. melitensis, per quanto del Br. abortus avesse i principali caratteri biologici e culturali. Credo che molta della confusione, e molti dei dubbi che — in fondo ingiustificatamente — si affacciano ancora oggi alla mente, derivino da questo: un po' dal volere e un po' dall'essere obbligati a usare delle denominazioni che creano dei falsi concetti. Quando si dice Brucella abortus ecco che si pensa subito ad un germe dotato di eccezionalissimo potere patogeno per l'uomo; il Brucella melitensis è invece dotato di massimo potere patogeno: ma perchè non ammettere anche l'esistenza di gradazioni intermedie? Ammetto benissimo che il Br. abortus in Italia o in Piemonte e in Lombardia sia scarsamente, anzi non mai dotato di potere patogeno per l'uomo, come fa rilevare il Prof. Bastai; ma ammetto anche che possa esistere un brucella abortus, se si vuole più vicino al tipo melitense, che sia dotato in grado maggiore di questa capacità.

Si è parlato spesso oggi di varietà porcina. Tutti sappiamo che l'aborto epizootico esiste anche nei suini ed è causa di gravi epidemie. Ora questo aborto epizootico sembra più virulento per l'uomo, stando almeno a quello che dicono gli autori americani, di quello che non sia l'aborto bovino, e sembra anzi accertato che dal punto di vista delle attività biologiche questo germe si avvicini più al tipo brucella melitense che non al tipo abortus bovino. Non è forse questa un'altra conferma della elasticità dei caratteri del Brucella, e fra questi anche del potere patogeno? Credo che non riusciremo mai a risolvere il problema finchè vorremo mantenere il criterio della netta distinzione dell'un germe dall'altro: l'unica soluzione plausibile sta nell'ammettere che siamo di fronte a un germe capace in differenti condizioni di assumere differente potere patogeno per l'uomo.

Il prof. Bastai ha ricordato le esperienze compiute a Portorico da Otero, le quali avrebbero dimostrato la possibilità di infettare l'uomo con abortus di varietà porcina. Conoscevo queste esperienze: non le ho ricordate appunto perchè essendo compiute con abortus di tipo porcino, che si avvicina assai per caratteristiche biochimiche e per virulenza al melitense, non credo se ne debba tenere un gran conto.

Il prof. Vercellana ha detto di aver avuto modo di studiare dal punto di vista della agglutinabilità aspecifica un ceppo di br. abortus del dott. Kristensen, e di aver notato che sotto questo aspetto tale ceppo si comportava come un tipico melitense. Posso dire che anch'io ho degli stipiti inviatimi dal dott. Kristensen — tre isolati dall'uomo e tre dai bovini — e ne ho studiato il metabolismo dello zolfo: orbene sotto questo aspetto tutti questi stipiti si comportano come dei tipici abortus, in quanto producono abbondantemente H_2S.

Quanto il prof. Stazzi ci ha fatto conoscere per mezzo dello scritto che il prof. Arnaudi ha letto, coincide con quello che si sa, essere il Brucella abortus raramente patogeno per l'uomo. Il prof. Stazzi dice che in Lombardia non risultano casi di infezione umana; non ho niente da dire su questo, e non credo che ciò possa infirmare quanto prima ho sostenuto.

Il Dott. Cantani ha giustamente richiamato l'attenzione su alcuni rilievi che egli ha compiuti sulla epidemiologia della febbre ondulante nella bassa Italia, e che sono in perfetto accordo con quanto in altre regioni è stato osservato. Accennavo appunto prima all'andamento della infezione sulle coste della Spagna, in Francia, in Algeria; si verificano a volta nuovi focolai di infezione a tipo epidemico, oppure si osserva una tendenza alla espansione della malattia.

Quanto ha detto il prof. Zironi è degno della massima considerazione, ed io anzi lo ringrazio di aver richiamato l'attenzione sulla possibilità della esistenza di particolari condizioni dell'ospite in rapporto a differenti possibilità patogene del br. abortus. Già altri autori hanno prospettato tale possibilità: Curschmann e Spengler — se ben ricordo — hanno sospettato che la infezione di Brucella abortus non possa verificarsi che in particolari condizioni di recettività dell'organismo. A questo proposito debbo far notare che spesso nel nord e centro Europa è stata constatata l'esistenza di infezioni latenti. Alcuni autori, Spengler specialmente, insistono sul fatto che una quantità non trascurabile di sieri esaminati rivela un netto potere agglutinante, senza che però sia constatabile uno stato di malattia: sono questi casi di infezione latente, che possono benissimo accordarsi con quanto il prof. Zironi ha fatto notare. È molto facile infatti pensare che basta che l'organismo non si trovi in condizioni di reattività perfette perchè l'infezione da latente divenga manifesta. Lo stesso prof. Zironi riferendosi a quanto è stato detto stamani, torna sulla questione della mutabilità dei germi, specialmente di questi, brucella abortus e brucella melitensis, che sono così vicini uno all'altro. Poichè le differenze messe in evidenza fra i due germi possono con grande facilità modificarsi sia spontaneamente, sia artificialmente con mezzi semplicissimi, non so se nel nostro caso è proprio da parlare di mutazione; io penso piuttosto che è sempre lo stesso germe che ci si presenta con aspetti differenti. Con esperienze di laboratorio è molto facile fare acquistare ad un abortus le caratteristiche di melitensis.

Il prof. Cerruti mi ha fatto un appunto, e mi domanda perchè ho difficoltà ad ammettere l'esistenza di un aborto epizootico sostenuto dal Brucella melitensis. Ebbene, di queste difficoltà ne ho principalmente due, anzi tre. Anzitutto perchè dovrei ammettere che il Brucella di tipo melitense è in certo modo ritornato indietro nel suo tipo biologico, perchè tanto le constatazioni epidemiologiche che quelle di laboratorio ci dicono che se una tendenza questo germe ha — questo germe che intendo come unico, e che dovrò chiamare soltanto brucella per non pregiudicarmi! — l'ha solamente in un senso, a passare cioè dal tipo aborto al tipo melitensis. In tal modo ho assai chiara nella mente anche la possibilità che talvolta l'abortus si dimostri eccezionalmente patogeno: viceversa non mi è agevole supporre che il melitensis risalga nella

scala dei tipi di Brucella, in fondo alla quale si trova, poichè ciò contrasta con l'evidenza di precisi fatti. In secondo luogo ho un'altra difficoltà: e cioè che in alcune regioni sarebbe necessario ammettere, più che una duplicità di aborto epizootico — quello contagioso dato dal br. melitensis, e quello non contagioso dato dal br. abortus. — che addirittura tutto l'aborto bovino fosse sostenuto dal br. melitensis, il che, come dicevo prima, contrasta sopratutto colla logica dato che è ben difficile sostenere che in una regione estesa come la Danimarca ove tutto l'aborto bovino praticamente è contagioso, il br. melitensis abbia soppiantato completamente il br. abortus. Ho poi un'ultima difficoltà di ordine biologico, e non meno importante. Che il br. abortus abbia delle caratteristiche culturali sue particolari, è noto fin da quando fu descritto per la prima volta da Bang. Ora, per l'appunto tutti i germi che sono stati isolati da Kristensen e — se vogliamo lasciar da parte Kristensen, che è stato un po' incriminato in questa discussione — dai ricercatori del centro e Nord Europa, risultano, ad es. dal punto di vista delle esigenze di isolamento, dei classici abortus. Per accettare la tesi del Prof. Cerruti dovrei dunque ammettere che il br. melitensis, arrivato a dare l'aborto bovino nell'alta Europa, ha acquistato i caratteri del br. abortus: ma se il prof. Cerruti concede che il melitensis può acquistare alcuni caratteri dell'abortus, mi domando perchè io non debbo ammettere che l'abortus ne acquisti alcuni del melitense, per esempio la patogenicità per l'uomo, se in appoggio a questo modo di valutare i fatti depongono dati di vario ordine, mentre nessun fatto depone a favore della tesi del Prof. Cerruti.

A quello che ha detto il Prof. Cantani non ho nulla da obbiettare. Egli ha dimostrato che esistono oscillazioni nel potere patogeno dei Brucella, e con ciò si ha una conferma di quanto ho detto sulla possibilità di larghi adattamenti, di larga elasticità che tali germi hanno. Burnet e Conseil dicono che bisogna abituarsi a pensare, se vogliamo renderci conto della epidemiologia, della febbre ondulante, che abbiamo da fare non con germi differenti, ma con un germe unico, plastico, adattabile; mi pare che non si potrebbe trovare giudizio più rispondente al vero di questo.

Dal prof. Micheli, così benevolo con me, e che sentitamente ringrazio, ho appreso con soddisfazione che Egli è d'accordo con me nell'ammettere che il Br. abortus possa essere eccezionalmente patogeno per l'uomo. Ciò mi fa piacere perchè mi induce a considerare che fra quello che Egli pensa e quello che io ho sempre pensato e penso tuttora non vi è che una differenza di quantità e non di qualità, e che quindi, giunti a questo punto, è facile raggiungere l'accordo. Per il prof. Micheli il Br. abortus è pochissimo patogeno per l'uomo; per me lo è un po' di più: non c'è grande differenza, basta pensare che questo germe, così elastico per i caratteri biologici, possa esserlo anche un poco riguardo al potere patogeno. Niente ci impedisce di pensarlo, anche perchè l'epidemiologia non della sola febbre ondulante, ma di qualsiasi altra malattia, ci dimostra l'instabilità di questo carattere. Per cui le lievi divergenze fra le idee del prof. Micheli e le mie non sono insuperabili, ma possono venire facilmente colmate (*applausi*).

Il *Presidente* prega il Prof. C. F. Cerruti di svolgere la sua comunicazione:

Caratteri epidemiologici dell'endemia di febbre ondulante in Piemonte.

Prof. Cerruti: I primi casi di f. ondulante accertati in Piemonte risalgono al 1906. Dopo di allora tale malattia fu osservata saltuariamente altre volte, ma solo nel dopo-guerra essa andò assumendo frequenza e diffusione tali da farla considerare endemica della regione.

Allo scopo di conoscere lo stato reale della diffusione della f. ondulante in Piemonte ho fatto un'inchiesta nell'ambiente sanitario ri-

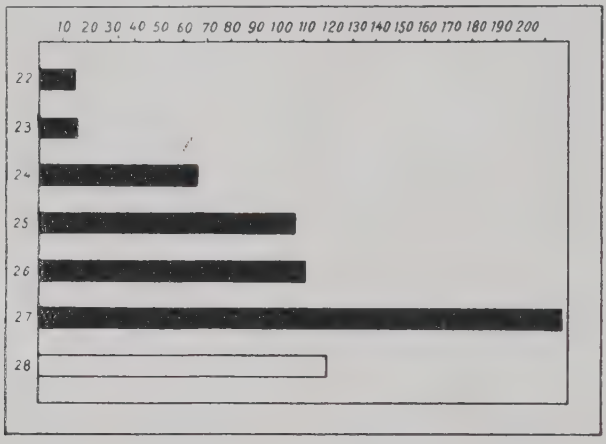


Fig. 1.

volgendo agli Ufficiali sanitari, ai medici condotti, ai primari, ai direttori d'Ospedale, ai laboratori d'indagine clinica un questionario redatto in modo da comprendere i dati più importanti circa l'epidemiologia di questa tenace infezione. Le risposte avute dai cortesi colleghi, i numerosi sopraluoghi da me personalmente eseguiti mi hanno permesso il controllo accurato di ogni singolo caso per cui tutti quelli considerati nei rilievi statistici si possono ritenere sicuramente accertati.

Nel complesso ho raccolto dati sufficienti su 648 casi di f. ondulante occorsi in Piemonte dal 1° gennaio 1922 al 30 giugno 1928. Il numero degli individui annualmente colpiti durante questo periodo di tempo risulta in aumento costante, si sale da un minimo di 13

nel 1922 a un massimo di 218 raggiunto nel 1927 (v. fig. 1). Anche il numero dei Comuni colpiti (v. fig. 2) è in aumento; si passa da 5 nel 1922 a 61 Comuni colpiti nel 1927. Il massimo raggiunto nel 1927 è tuttavia assai inferiore al numero complessivo (N. 125) dei diversi Comuni colpiti durante l'intiero periodo 1922-1928. In altre parole la f. ondulante, pur diffondendosi sempre più non è rimasta legata al luogo, alla popolazione in cui s'è manifestata una o più volte, e

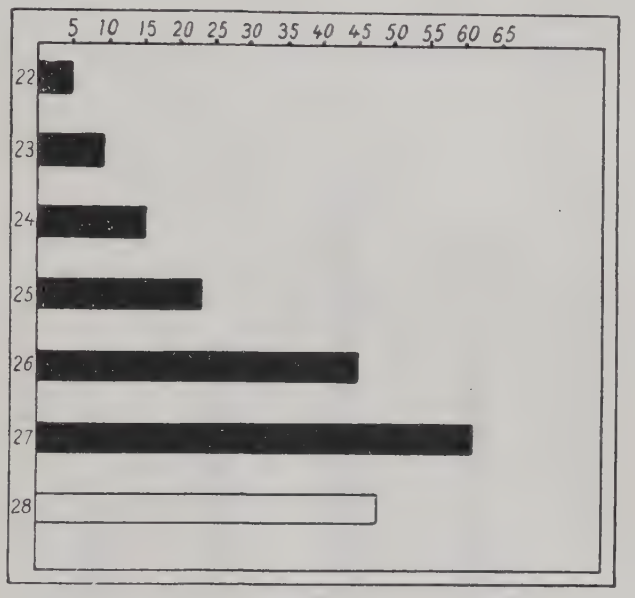


Fig. 2.

si può dire che di tutto il Piemonte solo la città di Torino ha sempre dato durante l'intiero periodo di tempo preso in osservazione un contributo annuale notevole e crescente di ammalati di f. ondulante.

La mortalità è stata leggermente inferiore all'1 % con un totale di 6 casi di morte occorsi in individui variamente tarati.

Tra le varie stagioni dell'anno (v. fig. 3) la primavera è quella che ha dato il maggior contributo di ammalati (200), seguita a breve distanza dall'inverno e dall'estate. Nell'autunno si è verificato il minor aumento di casi (26).

Dalla carta a fig. 4 ci si può fare una chiara idea della distribuzione geografica dei casi; le zone abitate del Piemonte non furono

tutte colpite. Il maggior numero dei casi si è addensato in Torino e nella regione agricola posta a sud-ovest di questa città e che in parte è compresa nel territorio della Provincia di Cuneo. Si può dire che tutti i paesi situati lungo le valli che scendono dal confine occidentale diedero il loro contributo d'ammalati, mentre la Valle d'Aosta è risultata apparentemente indenne. Nel territorio della Provincia di Alessandria e specialmente in Asti e nel suo circondario si sono verificati numerosi, piccoli focolai epidemici. Nelle Provincie di No-

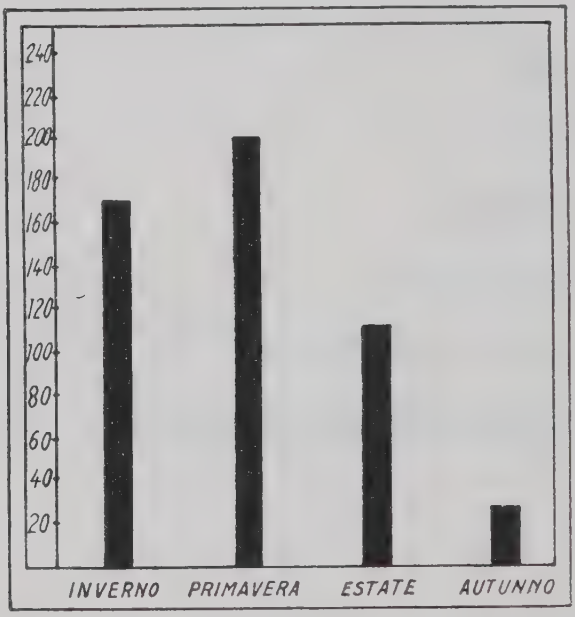


Fig. 3.

vara e di Vercelli si ebbero invece pochi casi sporadici. L'irregolare distribuzione territoriale dei casi di malattia trova una spiegazione nella ricerca delle fonti d'infezione. Si è potuto infatti accertare che la maggior parte dei casi di febbre ondulante, sia sporadici, sia raggruppati a focolaio, erano dovuti al contatto con ovini e bovini affetti da aborto epizootico. Sono stati per lo più i greggi di ovini trasmigranti per la monticazione o per lo svernamento, che hanno trasmesso il contagio agli uomini ed agli animali di altra specie, per lo più bovini, coi quali erano venuti a contatto.

Questi greggi provengono abitualmente dalle alte valli del Cu-

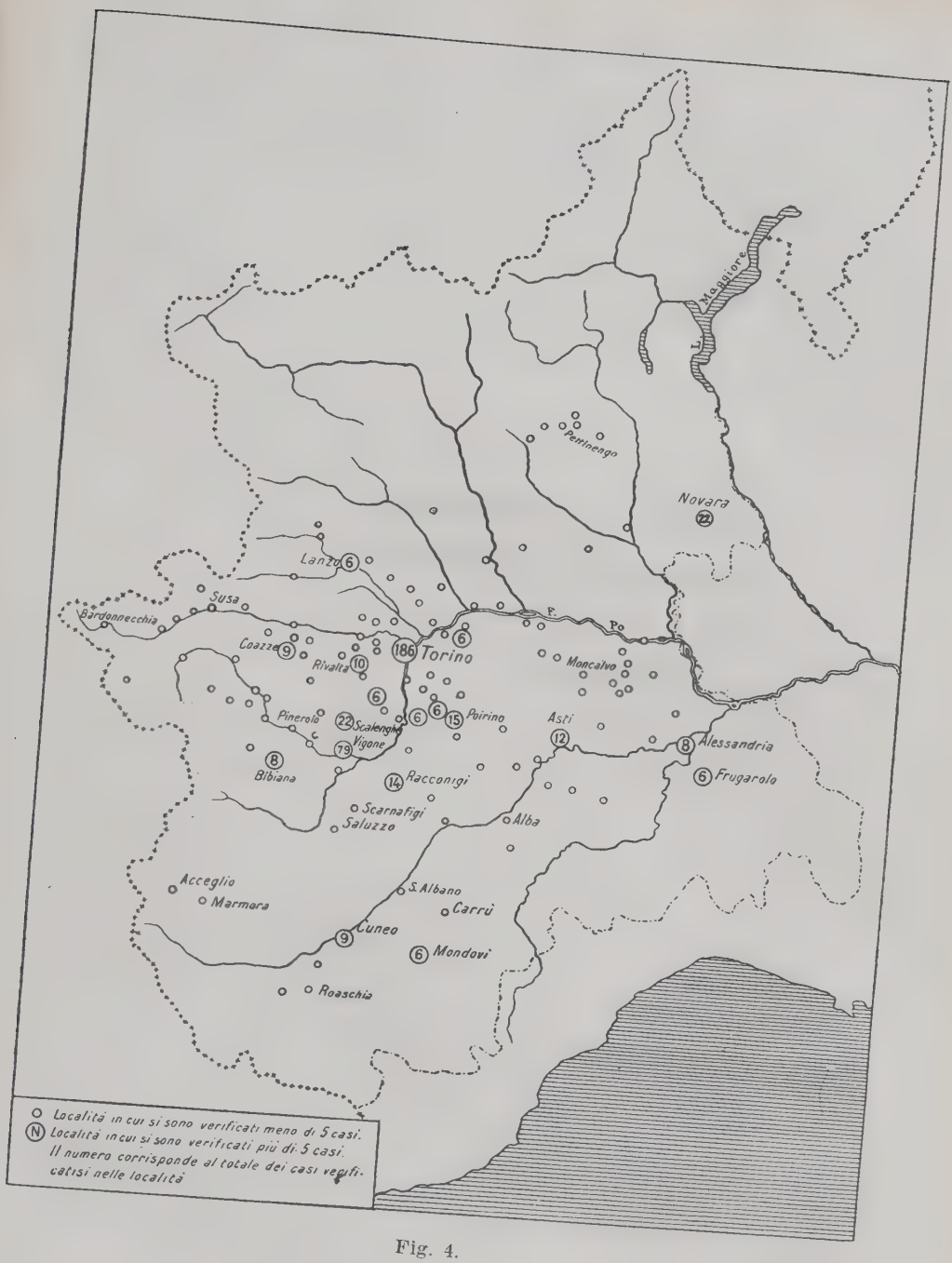

Maggiore
L.
Pertinengo
Novara
22
Lanzo
6
Susa
Bardonnecchia
F.
Po
Coazze
9
Rivalta
10
186
Torino
6
Moncalvo
Pinerolo
22
Scalenghe
6
6
15
Poirino
Asti
12
Vigone
79
8
Alessandria
8
Bibiana
14
Racconigi
6
Frugarolo
Scarnafigi
Saluzzo
Alba
Acceglio
Marmora
S. Albano
Carrù
Cuneo
9
6
Mondovì
Roaschia
Località in cui si sono verificati meno di 5 casi.
N Località in cui si sono verificati più di 5 casi. Il numero corrisponde al totale dei casi verificatisi nelle località

Fig. 4.

neese, Pinerolese e di Susa, e si distribuiscono nella maggior parte delle cascine situate nei dintorni di Torino e nell'Alessandrino. Anche le infezioni avvenute esclusivamente per via alimentare e che si sono verificate principalmente nei centri abitati ripetono la stessa origine. Potei individuare le probabili fonti d'infezione in 513 casi di f. ondulante che suddivisi in cinque grandi categorie (v. fig. 5). Nella I[a] categoria « Latte e suoi derivati » ho posto tutti quei casi di infezione in cui era assolutamente da escludere un diretto contatto con bestiame di qualsiasi specie, e l'ammalato beveva abitualmente latte od aveva consumato latticini freschi.

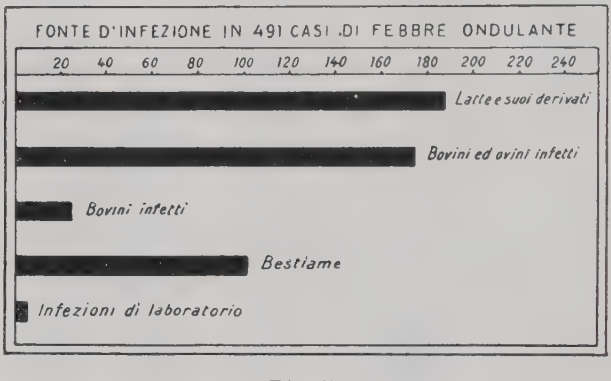


Fig. 5.

Nella II[a] categoria « Bovini ed ovini infetti » ho riunito i casi d'infezione insorti in individui che vivevano a diretto contatto con ovini, sia soli, sia frammisti a bestiame bovino. La precedente comparsa simultanea di numerosi casi di aborto tra questi ovini seguiti da casi di aborto nei bovini e da f. ondulante nell'uomo fecero presupporre che lo stesso germe che aveva determinata l'infezione negli ovini fosse la causa della malattia nei bovini e nell'uomo. In parecchi casi le pecore di un solo gregge infetto provocarono l'insorgenza di numerosi focolai di f. ondulante nell'uomo e di concomitanti epizoozie d'aborto tra i bovini appartenenti alle stalle in cui le pecore erano state distribuite per lo svernamento.

La categoria seguente « Bovini infetti » è costituita invece da quei casi di f. ondulante verificatisi tra individui che vivevano a stretto contatto con soli bovini affetti da aborto epizootico, con esclusione degli ovini.

La IV^a^ categoria « Bestiame » raggruppa tutti quei casi di f. ondulante in cui furono colpite persone che ebbero frequente occasione di contatti con bestiame di varia specie e particolarmente bovini, tra cui le indagini praticate non svelarono la presenza dell'aborto epizootico.

Le « infezioni di laboratorio » si sono limitate a tre casi osservati in medici che avevano spesso occasione di maneggiare culture di Brucelle.

Non è da escludere in modo affatto sicuro che qualcuno dei casi registrati in una delle categorie di fonti d'infezione siano stati in realtà dovuti ad un'altra sorgente di contagio. Specialmente il latte e i suoi derivati possono avere dato origine a una parte dei casi ascritti invece alle categorie dei contatti con bestiame. Perciò credo opportuno rinunciare a trarre dai dati raccolti dei rapporti percentuali e mi limito ad attribuire ai medesimi un valore puramente indiziario. È degno di nota il fatto che il contagio interumano non ha avuto che secondaria importanza come fonte d'infezione.

La controversa questione dei rapporti che intercorrono tra l'aborto epizootico del bestiame, particolarmente bovino, e la f. ondulante nell'uomo mi ha indotto a svolgere parallelamente un'inchiesta su questa grave epizoozia. In base alle notizie avute dai Veterinari provinciali, da quelli condotti, dalla locale Stazione sperimentale per le malattie infettive del bestiame, mi sono convinto che l'aborto epizootico è diffuso in tutto il Piemonte, mentre il decorso così vario e a volte veramente enigmatico che questa infezione presenta, in pratica non permette di escludere con sicurezza l'esistenza del contagio in un determinato gruppo di animali apparentemente indenni. D'altra parte la facilità degli scambi, la rapidità dei mezzi di trasporto danno modo ai singoli agricoltori di disfarsi agevolmente dei capi di bestiame che hanno abortito o delle mucche che acquistate per buone risultano sterili, sicchè l'infezione può facilmente diffondersi da un luogo all'altro del Piemonte sfuggendo ad ogni controllo.

Potei tuttavia studiare nei bovini singoli focolai di aborto infettivo, in cui, date le condizioni d'allevamento, si ebbero elementi sicuri per un lungo periodo d'anni. Ad esempio, in due allevamenti, situati poco lontano da Torino e comprendenti più di un centinaio di mucche ciascuno, l'aborto causa oggi una perdita all'incirca del 20 % dei prodotti.

Le indagini della locale Stazione per le malattie infettive del bestiame accertarono che l'infezione abortigena è dovuta a microrga-

nismi del gruppo Brucella. Ciò nonostante a tutt'oggi non si è verificato nessun caso di f. ondulante tra il numeroso personale addetto e neppure tra i componenti le rispettive famiglie. Da due anni a questa parte le mucche di questi allevamenti sono state ripetutamente inoculate, a scopo preventivo e curativo, con B. di Bang vivi e virulenti, e neppure dopo questo trattamento si sono avuti casi di f. ondulante nell'uomo. D'altra parte potrei citare numerosi esempi di aborto in bovini, seguiti a breve distanza da casi di f. ondulante tra le persone che avevano accudito questi animali o ne avevano bevuto il latte. Quasi sempre l'origine dell'infezione abortigena in questi bovini, risaliva all'ingresso nella stalla di una o più pecore che avevano precedentemente abortito e che appartenevano a greggi nei quali si erano riscontrati numerosi casi d'aborto.

Si è insomma potuto osservare che in Piemonte esistono contemporaneamente focolai di aborto epizootico tra i bovini che non risulta abbiano mai dato origine a casi di f. ondulante nell'uomo, ed altri focolai, clinicamente identici ai primi e batteriologicamente uguali perchè dovuti anch'essi a microrganismi del gruppo Brucella, che si accompagnano a casi d'infezione nell'uomo. I primi sono i più frequenti e sono specialmente diffusi tra il bestiame bovino allevato nel basso Novarese e nel Vercellese; i secondi, ossia quelli pericolosi anche per la specie umana, meno numerosi, si accompagnano quasi sempre alla presenza di ovini, e si incontrano specialmente nell'Alessandrino, nelle colline del Monferrato, nei dintorni di Torino e lungo le valli che discendono dal confine occidentale. Le condizioni ambientali si possono ritenere uguali tanto nell'uno che nell'altro caso, dimodochè credo che il diverso comportamento verso la specie umana manifestata da questi microrganismi apparentemente identici, sia da ritenersi dovuta a una reale differenza di potere patogeno insita nella natura biologica dei due tipi di Brucella, anzichè determinata dalla presenza di particolari cause esterne, occasionalmente riunite insieme.

Discussione.

Prof. Rigobello. – Vorrei chiedere al prof. Cerruti se ha preso conoscenza dei casi di febbre maltese lungo la Valle del Tanaro, perchè la valle del Tanaro si presenta molto bene per ritornare alla veduta prima, più antica, cioè che l'infezione melitense sia trasmessa piuttosto dalle capre, anzichè per il tramite dei bovini. La febbre melitense è endemica nella zona circostante ad Alba;

nella zona delle Langhe e nell'astigiano e successivamente noi troviamo zone anche nel Tortonese. Ne ho preso conoscenza per l'esame diretto di ammalati, esami sierologici, ed ho dovuto riscontrare che effettivamente la genesi di questo melitense è infallibilmente di origine caprina. In un caso solo a Tortona vi fu infezione del veterinario ed anche di una del personale addetto al macello, infezione presa da bovini macellati, bovini che risultavano sani. Risultava però anche che questi bovini provenivano dall'Astigiano e precisamente da zone in cui vi erano casi di Melitense e quindi erano stati semplicemente dei vettori, dei portatori passivi e null'altro. Sarebbe interessante poter vedere se effettivamente i caprini ed ovini non possono contare molto di più di quello che si creda nell'epidemiologia della melitense in Piemonte.

Prof. Cerruti. – Nella mia comunicazione mi sono limitato ad accennare soltanto alla distribuzione geografica della f. ondulante in Piemonte. In realtà nella provincia di Alessandria, e specialmente nei dintorni di Asti e sulle colline del Monferrato si sono avuti numerosi focolai epidemici di f. ondulante molto interessanti. Debbo aggiungere che non ho parlato esplicitamente delle capre come agenti di diffusione della f. ondulante in Piemonte, perchè, per amor di brevità, mi sono permesso di comprendere i caprini negli ovini, dato che questi sono la grande maggioranza e le capre sono quasi sempre mescolate ai greggi di pecore transmigranti in numero di una o due per gregge.

Il *Presidente* prega il Prof. Cerruti di svolgere la sua seconda comunicazione:

Sulla pretesa differenziazione di specie nel genere *Brucella*.

Prof. Cerruti: Da quando A. Evans fece rilevare la stretta rassomiglianza, per non dire l'identità, dei caratteri morfologici, biochimici e culturali del M. Melitensis e del B. abortus, furono fatti numerosi tentativi per riuscire a confermare con qualche mezzo di laboratorio la diversa origine dei due microrganismi. Queste ricerche erano giustificate anche dal fatto che dati epidemiologici e prove sperimentali portavano ad attribuire al M. Melitensis spiccato potere patogeno sia per l'uomo, sia per gli animali; al B. abortus potere patogeno solo per gli animali, specie per i bovini.

Dei vari metodi proposti nessuno si dimostrò sinora adatto a raggiungere lo scopo prefisso. I caratteri distintivi messi in evidenza da qualche autore o non hanno importanza tale da costituire elementi sicuri di differenziazione tra i due microbi, o si sono dimostrati molto variabili sia spontaneamente, sia sotto l'influenza di artifici

vari, quali azioni chimiche, fisiche, serologiche, ecc. In precedenti ricerche mi occupai dei più importanti di questi metodi, e cioè del diverso comportamento di fronte al calore delle agglutinine anti-melitensis ed antiabortus, dell'agglutinazione aspecifica mediante l'acido lattico e dell'assorbimento delle agglutinine, senza poterne confermare integralmente alcuno.

Di recente Huddleson propose di servirsi della diversa azione batteriostatica o, meglio, del diverso potere di impedimento dello sviluppo esercitato da alcune sostanze coloranti della serie del trifenilmetano e della tiazina sugli stipiti appartenenti al genere « Brucella » (Feusier e Meyer, 1920), per poterli differenziare in modo corrispondente a quello dell'origine in tre diverse specie « melitensis », « abortus » e « suis ». Secondo Huddleson il violetto di metile aggiunto all'agar fegato nella proporzione di 1: 100.000 permette lo sviluppo di Br. melitensis e Br. abortus, ma impedisce quello di Br. suis. La fucsina basica nella diluizione di 1: 50.000 esercita la stessa azione del violetto di metile. Mentre la tionina ad ugual concentrazione della fucsina impedisce lo sviluppo di Br. abortus e riesce indifferente a Br. melitensis e Br. suis. Si deve notare che in un primo tempo Huddleson, in collaborazione con E. Abell, aveva proposto il solo violetto di metile come idoneo e sufficiente a differenziare per la sua diversa azione batteriostatica Br. melitensis da Br. abortus, ma successive ricerche gli consigliarono di estendere ad altre sostanze coloranti il compito di stabilire l'origine dei diversi stipiti appartenenti al Gen. Brucella.

Servendomi degli stipiti di Brucella da me posseduti e cioè di 4 stipiti, isolati dall'uomo, e di 4 isolati da bovini, inviatimi gentilmente dal dott. Christensen, dell'Istituto sieroterapico danese; di altri 8 stipiti isolati dall'uomo, in Piemonte; di 1 stipite isolato dalla pecora, ed un altro dal maiale, in Ungheria; in totale di 18 stipiti di diversa origine, ho voluto studiarne il comportamento di fronte alla triplaflavina, al cistal-violetto ed alle diverse sostanze coloranti suggerite da Huddleson, attenendomi scrupolosamente alla tecnica seguita da questo autore.

Il metodo consiste nel seminare delle piastre di agar al fegato, leggermente acido (pH 6,6), con sospensioni omogenee di Brucella tratte da culture su agar-fegato di 48 ore; nel tenere le piastre a 37° e procedere, dopo tre giorni d'incubazione, alla lettura dei risultati. Nella tavola seguente ho riunito i dati raccolti nel corso delle prove.

Origine degli stipiti		Violetto di metile	Fucsina bas. 1 : 50.000	Tionina 1 : 50.000	Tripla-flavina 1 : 200.000	Cristal-violetto 1 : 100.000
Umana	Br. 3	+	+	+	+	+
	» 11	+	+	+	—	
	» 27	+ —	+	—	—	+
	» 28	+	+	+	+	+
	» 29	—	+	+ —	+	—
	» 30	+	+	+	+	+
	» 32	—	+	—	+	+ —
	» R	+	+	+	+	+
	ab. 20 Chr.	—	+	+	—	+
	» 21 »	—	—	— —	—	— —
	» 22 »	+	+	+	+ —	+
	» 23 »	+ —	+	—	—	+
Bovina	ab. 9 Chr.	—	+	+	+ —	+
	» 10 »	—	+	+	—	—
	» 11 »	—	+	+	+ —	+
	» 12 »	—	+	—	—	—
Suina	Bg. suino	+	+	+ —	—	+ —
Ovina	Bg. pecora	+ —	+	—	—	+ —

Ho eseguito le prove almeno due volte con lo stesso stipite ed in genere ho osservato ugual comportamento o lievi differenze nello sviluppo dall'una all'altra prova. Ripetendo l'esperienza con brodo al fegato invece che con agar ho notato in alcuni casi una netta diversità dei risultati, ma non ho creduto opportuno riunirli a quelli ottenuti con l'agar. Pur limitandoci a questi è facile osservare come non vi sia alcuna corrispondenza tra l'origine reale degli stipiti e quella che assegnerebbe loro la diversa azione batteriostatica delle sostanze addizionate ai terreni di cultura, nè si osservano le sole combinazioni contemplate da Huddleson. In altri termini vi sono stipiti che si sviluppano bene in presenza di tionina e fucsina basica, ad 1 : 50.000, e risentono l'azione inibitrice del solo violetto di metile; altri invece si sono sviluppati solo in presenza di fucsina, mentre sia il violetto che la tionina ne hanno impedito lo sviluppo. A parte queste sconcordanze, che da sole consiglierebbero il rigetto del metodo mi preme far rilevare che lo stesso Huddleson ha potuto osservare la mancanza di correlazione tra l'esito delle prove di batteriostasi e l'origine degli stipiti, senza attribuire per altro ad essa

alcuna importanza. In realtà per molte specie batteriche l'origine di uno stipite non ha alcuna importanza per la sua identificazione, perchè abbiamo a nostra disposizione numerosi altri caratteri, ben definiti e stabili, che ci permettono di ascrivere con sicurezza uno stipite in esame ad una specie piuttosto che all'altra. Ma nel genere Brucella, a tutt'oggi, non possediamo alcun mezzo di laboratorio che ci permetta la differenziazione sicura di uno stipite dall'altro. Solo l'origine, e più ancora i dati epidemiologici che si connettono con essa, ci permettono una distinzione provvisoria se non sicura tra l'uno e l'altro stipite di Brucella.

I tentativi sinora fatti per distinguere con mezzi di laboratorio i vari tipi di Brucella hanno sempre avuto di mira la corrispondenza con l'origine degli stipiti, ed è solo quando essa veniva a mancare che l'autore del tentativo si sentiva inevitabilmente trascinato a negare qualsiasi importanza differenziale all'origine stessa degli stipiti.

Certamente nel gruppo Brucella, con mezzi diversi, si possono distinguere vari tipi batteriologicamente distinti, ma non si può attribuire loro soverchia importanza e tanto meno indicarli con nomi che presuppongono un'origine affatto arbitraria senza un corrispondente insieme di caratteri tali da permettere l'identificazione di uno stipite anche senza il sussidio del dato fornito dall'origine reale.

Quando si voglia prescindere dai dati epidemiologici, allo stato attuale della questione, noi non possiamo riconoscere nel genere Brucella che una sola specie batterica, in cui si possono distinguere con vari mezzi una serie assai numerosa di tipi con caratteri non ben definiti, facilmente mutevoli sotto la spinta delle influenze più varie, che dimostrano la notevole plasticità della specie in questione.

Il *Presidente* prega il Dott. Brotzu di svolgere la sua comunicazione:

Sui rapporti tra bacillo di Bang e micrococcus melitensis.

Dott. Brotzu: Nello studio della febbre ondulante è facile rilevare come tale malattia si presenti dal punto di vista epidemiologico in due modi perfettamente diversi. Un tipo epidemiologico è quello che il morbo manifesta nelle regioni del bacino meridionale del Mediterraneo, dove prima ha richiamato l'attenzione degli studiosi, e dove la malattia è tanto frequente da aver talvolta meritato il nome della

regione stessa (a Malta dal 1898 al 1905 si verificavano annualmente da 600 ai 700 casi tra la popolazione civile).

Un tipo epidemiologico diverso è invece quello che la febbre ondulante presenta in quelle regioni, dove si notano soltanto dei piccoli focolai limitati generalmente a qualche casa colonica, in cui esistano dei bovini affetti da aborto epizootico. La malattia suole in questi casi restare limitata a quei boari che hanno assistito le vacche durante l'aborto e eventualmente ai veterinari. Nelle indagini epidemiologiche intorno a questi casi sporadici si nota solo talvolta che la comparsa dei casi di aborto nei bovini e di febbre ondulante nell'uomo è stata preceduta dalla presenza nelle stalle, o nelle vicinanze, di capre o di ovini (Come nel caso descritto da Frugoni nel Padovano, da Bastai e Cerutti nel Piemonte, e da altri osservato in Romagna).

La difficoltà della trasmissione della febbre ondulante dalle vacche all'uomo è talvolta grandissima. Nel Bresciano per esempio, l'aborto è frequentissimo nei bovini, e pure la febbre ondulante è quasi sconosciuta, per quanto essa vi sia stata appositamente ricercata; in Germania, in Inghilterra, in Polonia, regioni dove l'aborto è frequente tra i bovini, la febbre ondulante è talmente rara, che i casi sono considerati meritevoli di essere particolarmente segnalati, come quelli descritti da Weilchenblau, Legezynski, Kreuter, Dietel, Hals Horst.

In Danimarca, dove pure si è notato ultimamente una certa diffusione, i casi sono indubbiamente rari, tanto che finora non avevano attirato l'attenzione dei medici, e che la malattia è stata scoperta più che altro da una ricerca di laboratorio, eseguendo cioè sistematicamente l'agglutinazione per M. Melitensis, sui sieri inviati per altre analisi (in 20 mesi su 3.400.000 abitanti ne sono stati segnalati 500 casi). D'altro lato vicino a queste osservazioni che indicano la particolare rarità dei casi in tali regioni, stanno le indagini di Aublant, che nella Francia Meridionale ha osservato, che la distribuzione della febbre ondulante coincide perfettamente con la presenza delle capre, e le osservazioni di Clearkin, che, a Kenia, dove pure esisteva da molto tempo l'aborto epizootico, ha visto comparire la febbre ondulante soltanto dopo l'importazione di capre affette di M. Melitensis.

Mentre queste caratteristiche epidemiologiche sembrano ben chiare, e a tutta prima suggeriscono l'idea di una differenza fra i due germi, le prove di laboratorio non hanno corrisposto a tale concetto.

Numerosi sono stati i metodi proposti per la diagnosi differenziale, e senza entrare per brevità in particolari, possiamo così riassumerli:

1° Differenze morfologiche e di colorabilità.

2° Differenze di sviluppo (Ph dei terreni, tensione dell'ossigeno, colore della patina delle colture su patata alcalina, diversa intensità di sviluppo su terreni esauriti, su terreni alla tionina, e al violetto di metile).

3° Differenza di ricambio (NH_3, Amminoacidi, consumo di glucosio).

4° Differenza di agglutinabilità specifica e aspecifica.

5° Differenza di coagubilità col calore.

6° Differenza di patogenicità e di quadro anatomo-patologico sia nell'uomo che in diversi animali.

Per investigare tutti questi caratteri mi sono servito di Bang isolati da bovini, e provenienti, almeno in parte, da zone, dove non è la febbre ondulante, e di Melitense isolati da capre in regioni Mediterranee, dove la malattia è invece endemica, e ultimamente anche di Brucelle isolate da suini.

Differenze morfologiche e di colorabilità. — Come ben ha osservato il Favilli le differenze di forma sono poco costanti: generalmente si può notare che per M. Melitensis prevale la forma coccica e per il bacillo di Bang quella batterica, ma tali differenze non sono stabili e facilmente si annullano nei passaggi successivi al primo isolamento.

La differenza di tingibilità secondo il metodo di colorazione del Bezssonof, proposto dal Vercellana, non ha dato nelle mie mani proprio alcun risultato buono, come del resto ha pure riscontrato l'Andrei.

Differenze di sviluppo. — *a*) Secondo il Ph dei terreni. Coltivati i germi in agar comune avente Ph 6,5 ho avuto in genere uno sviluppo maggiore dei Bang che dei Melitense, ma la differenza è stata troppo lieve e non costante.

b) Tensione dell'ossigeno. La tendenza del Bacillo di Bang a crescere in terreni con scarso ossigeno è nota da molto tempo (vedi infatti diversi metodi di isolamento proposti da alcuni). Nel 1928 io indicavo il diverso modo di crescere in terreno Noguchi dove il M. Melitensis sviluppa dando una pellicola tra olio di vaselina e

liquido ascitico, mentre il Bang non lo presenta. Tale fenomeno è da mettersi in rapporto evidentemente con il diverso *optimum* della tensione di ossigeno. In questi ultimi tempi il Mc. Alpine ha confermato tali differenze di sviluppo a seconda dell'aggiunta di CO_2 all'ambiente, in cui si eseguono le culture.

Questo fatto è indubbiamente abbastanza costante, pur tuttavia non manca qualche rara eccezione, e, per di più, si può osservare che nei passaggi successivi il M. Melitensis si abitua a vivere con minori tensioni di ossigeno, tanto che scompare il diverso comportamento nei terreni Noguchi.

c) La caratteristica del Bacillo di Bang di sviluppare su patata alcalina producendo delle patine più oscure non sembra secondo le mie prove avere neanch'essa alcuna costanza.

d) Su terreni esauriti (brodo) i nostri stipiti si sono generalmente comportati molto irregolarmente. Nel complesso delle prove sembrerebbe doversi concludere che ciascun germe tende ad esaurire il terreno verso se stesso, mentre verso altri stipiti aventi origine omologa od eterologa si comporta senza alcuna regola.

e) L'Huddleson afferma che il M. Melitensis non sviluppa su terreni (agar fegato) che contengano della tionina (1 : 50.000) o del metilvioletto (1 : 100.000) (o anche mediante fuxina e violetto di genziana) i quali permettono invece lo sviluppo del Bang. Il lavoro ha trovato conferma nelle ricerche del Kristensen, e in Italia del Saita ; ma nelle mie prove di controllo debbo anche qui far notare che mentre l'osservazione mi è sembrata in genere esatta non manchino tuttavia le eccezioni che tolgono in parte valore al metodo.

Differenze di ricambio. — Il Mc. Alpine e lo Slanetz hanno studiato il ricambio dei bacilli *abortus,* bovini, umani, porcini, e dei M. Melitensis.

Essi hanno visto che coltivando i germi in acqua peptonizzata (peptone Fairchild's) e glucosata all'1 %, per i M. Melitensis, e per gli abortus porcini, ed umani, si ha una diminuzione dei Ph. nei primi sei giorni di cultura, una percentuale invariata o quasi di azoto ammoniacale e amminoacido, e un consumo di glucosio fino al 18 %, mentre per l'aborto bovino si fa una diminuzione dell'azoto amminoacido, un'aumento del Ph, e dell'ammoniaca, mentre il glucosio resta costante.

Tali ricerche sono state da me controllate su una parte degli stipiti con risultati, che confermano in genere le ricerche di Mc. Al-

pine. Talvolta però qualcheduno dei caratteri su indicati manca così, per es., vi sono stati dei Melitense che non hanno consumato del glucosio, e dei bacilli di Bang, che hanno dato un consumo fino al 10 %; la produzione dell'amoniaca da parte del M. Melitensis, e degli aborti porcini è stata nulla nei primi 7 giorni, ma verso il 14° giorno qualche stipite ha raggiunto delle cifre metà di quelle fornite dai bacilli dell'aborto bovino. Il Ph è rimasto invariato tanto con uno stipite di Bang, che con uno stipite di M. Melitensis. Anche per quanto riguarda dunque il ricambio, secondo quanto ho riscontrato io, non mancano quindi le eccezioni, e le irregolarità di comportamento, che possono rendere difficile la diagnosi di tipo.

Differenze di agglutinabilità. — È noto che il bacillo di Bang è più agglutinabile ed agglutinogeno del M. Melitensis. Chiunque esegua delle ricerche con stipiti di Bang e di M. Melitensis osserva facilmente che il primo dà delle agglutinazioni a titolo più elevato del secondo. Così per es., avendo preparato una trentina di sieri agglutinanti immunizzando dei conigli con altrettanti stipiti, tale risultato fu talora così evidente, che non mi sembrava dover essere difficile formare dei gruppi separati; osservando però i particolari, potevo rilevare che certi stipiti di Bang erano anch'essi poco agglutinabili, e che invece alcuni stipiti di Melitense presentavano delle agglutinazioni a tasso elevato. La prova di assorbimento delle agglutinine, in cui, all'inizio delle ricerche, avevo riposto speranze non mi ha dato alcun buon risultato con i sieri immuni di coniglio, come pure le agglutinazioni secondo il metodo di Ficai e Alessandrini e il metodo Domingo.

Risultati pure poco concludenti ho avuto con l'agglutinazione aspecifica con acido acetico al 1 : 500.

Differenze di coagulabilità con il calore. — La coagulabilità col calore del paramelitense è ben nota, ma anche per il Melitense il Valenti ha osservato che mediante l'ebollizione prolungata si può ottenere la coagulazione di essi nell'82 % dei casi mentre tale fenomeno si ottiene per i bacilli di Bang soltanto nel 20 %.

Tale osservazione è stata da me riscontrata perfettamente esatta, mentre il metodo della termodelipoidizzazione proposto dal Valenti non può avere da me alcuna conferma; d'altra parte, come altri ha anche osservato, tra i protocolli del Valenti non è difficile osservare qualche stipite che fa eccezione alla regola. E se noi ricordiamo inol-

tre che la coagulabilità di una Brucella può essere ottenuta, ove la si coltivi su terreni speciali (siero agglutinante secondo Favilli, con terreno Noguchi secondo me) s'intende facilmente come non si possa basare su un carattere così oscillante la differenziazione di un germe.

Differenze di potere patogeno. — Che il bacillo di Bang oltre che essere meno patogeno per l'uomo lo sia anche per alcune specie animali, e che in esse possa dare qualche differenza anatomo-patologica sembra pure certo.

Nelle scimmie si riesce infatti bensì a riprodurre la malattia con l'inoculazione del bacillo di Bang (Fleischner e Mayer, Khaled) ma occorre inoculare delle dosi molto grandi (circa mille volte maggiori che con M. Melitensis).

Nelle cavie infettate con il M. Melitensis si osservano nel fegato e nella milza dei noduli linfatici talvolta necrotici, molto più grandi di quanto non si possono osservare nell'infezione da Bang. Su questi fatti sembrerebbe lecito dunque affermare che le Brucelle provenienti da capre hanno potere patogeno maggiore per scimmie e per le cavie.

Conclusioni. — Le indagini di laboratorio, mentre dunque fanno intravedere la possibilità di distinguere due gruppi fra le Brucelle, di cui uno è composto da stipiti prevalentemente bovini e l'altro di stipiti prevalentemente caprini, non permettono di separarli in modo definitivo e di indicare un metodo che valga a distinguerli in modo sicuro, perchè ora uno stipite ora un'altro si distaccano per qualche carattere dal gruppo cui legittimamente per la loro provenienza dovrebbero ascriversi. Quella della Brucelle è infatti una specie batterica in cui domina in modo spiccatissimo la variabilità del germe a seconda del terreno in cui vive. Tra questi caratteri oscillanti ci insegna la epidemiologia che noi dobbiamo porvi anche la patogenicità per l'uomo, che mentre in genere è più spiccata negli stipiti isolati da capra (come pure da ovini e forse anche da suini) lo è molto meno negli stipiti isolati da bovini. I bovini possono essere dunque considerati come un'ambiente in cui tali germi tendono a perdere la loro virulenza per l'uomo, che si può infettare da essi soltanto quando si trovino condizioni di non buona resistenza o quando abbia contatto con grandi quantità di germi (come per es., durante l'aborto) o con stipiti relativamente virulenti, come possono essere per es., quelli provenienti da infezioni recenti da capre.

	Medie di agglutinabilità specifica	Agglutinabilità con acido acetico	Sviluppo su Noguchi	Coagulabilità a 100°	Sviluppo su agar e violetto metile	Sviluppo su agar e tionina	Sviluppo su agar acido Ph 6,5	Ph del terreno 7 giorni dopo	NH_3 prodotta %	Glucosio assorbito
Bang (Bologna)	+ + +	+	intorbidam. uniforme	—	+ + +	+ + +	+ ±	7,0	gr. 0,000	0%
» (Milano) 1	+ + +	+ +	» »	—	+ + +	+ + +	+ ±	7,0	» 0,003	2,5 »
» » 2	+ + +	+ +	» »	—	+ + +	+ + +	+ ±	7,2	» 0,003	10 »
» (Germania) 380 ...	+ + ±	—	» »	—	+ + +	+ + +				
» (Pasteur) 465.....	+ + ±	+ +	» »	—	+	+ + —	+ +			
» (Preisz) 1	+ +	+ + ±	lieve pellicola superf.	+	+ + ±	+ + +	+ + ±			
» » 2	+ + ±	+ + ±	intorbidam. uniforme	—	+ + +	+ + —	+ + ±	7,0	gr. 0,003	2,5%
» (Madsen) 1	+ + ±	+ + +	» »	—	+ + +	+ + +	+ +			
» » 2.....	+ + ±	+ + +	» »	—	+ + +	+ + +	+ +			
» » 3.....	+ + ±	—	» »	—	+ + +	+ + +	+ +			
» » 4.....	+ + ±	—	» »	—	+ + +	+ + +	+ +			
Porcini 1 (Mc. Alpine)..	.....	.....	Pellicola superfic.	.....	+ ± —	+ + —	+	6,8	0	10%
» 2 » »	.....	.....	» »	.....	± ± —	+ + +	+	6,8	0	10 »
» 3 » »	.....	.....	» »	.....	±	+ — —	+	6,8	0	18 »
» 4 » »	.....	.....	» »	.....	± +	+ + —	+	7,0	0	8 »
Capra 1 (Di Mattei)....	+ +	—	» »	+	+ —	+ + +	±	6,9	0	0 »
» 2 »	+ +	+ + +	» »	+	+ —	+ + +	±	6,9	0	0 »
» 77 (Nicolle).....	+ + +	—	» »	±	+ —	+ + +	+ ±	7,0	0	12 »
» 31 (Sergent)	+ + ±	+ + +	» »	+	+ —	± — —	+ ±	6,8	0	12 »
» 13 »	+ +	+ ±	» »	—	+ —	+ — —	+	6,9	0	10 »

Il *Presidente* prega il Prof. G. Favilli di fare la sua comunicazione:

Il metabolismo dello zolfo nei batteri della specie Brucella melitensis.

Prof. Favilli: Dalle ricerche di Huddleson e collaboratori risulta che le diverse varietà della specie Brucella Melitensis non sono dotate di uguali proprietà metaboliche verso lo zolfo: e cioè il Brucella abortus, isolato dalla vacca colpita da aborto epizootico, o dai suini, o dall'uomo che si è contagiato da quella o da questi, scinde in quantità più o meno grande, ma sempre notevolissima, lo zolfo contenuto in alcuni componenti di determinati terreni, trasformandolo in idrogeno solforato; mentre il Brucella Melitensis isolato dalle capre e dall'uomo e il Paramelitensis, non elaborano affatto, o quasi, idrogeno solforato. Le prove eseguite fino ad ora per stabilire il valore differenziale di questa proprietà sono scarsissime, e non risultano anzi dalla letteratura che quelle di Kristensen e Holm, compiute su stipiti di br. abortus di provenienza umana e bovina isolati in Danimarca, e quelle di Duncan su stipiti di br. abortus della Rhodesia; ho voluto quindi studiare il metabolismo dello zolfo sull'abbondante materiale di cui disponevo, e cioè sulla collezione di Brucella esistente nel nostro Istituto. Si tratta di 110 stipiti così ripartiti:

51 stipiti di br. abortus isolati da vacche colpite da aborto epizootico;

13 stipiti di br. abortus isolati da suini;

13 stipiti di br. abortus isolati dall'uomo contagiatosi dai bovini;

4 stipiti di br. abortus isolati dall'uomo contagiatosi dai suini;

29 stipiti isolati dalla pecora o dalla capra o dall'uomo contagiato da questi animali; fra questi stipiti sono compresi 7 tipici paramelitensis.

La provenienza degli stipiti mi è stata sempre nota, e egualmente una breve storia del modo e del tempo in cui furono isolati. Alcuni provengono dall'America del Nord; la maggior parte, circa 90, da varie parti di Europa: Italia, Malta, Ungheria, Germania, Danimarca.

Il metodo seguito è quello dettato da Huddleson, che consiste nel seminare i germi su agar-fegato preparato con speciali cautele: questo terreno contiene degli amminoacidi solforati dai quali, se vengono

attaccati dal germe che si coltiva, si sviluppa idrogeno solforato libero. Per rivelare questo composto si introduce nei tubi di cultura una cartina all'acetato di piombo. Tenevo in osservazione le culture per un minimo di 72 ore. Ho constatato i seguenti fatti.

Dei 51 stipiti di br. abortus di provenienza bovina soltanto 4 non hanno dato alcuna produzione di H_2S. Dei rimanenti 48, cinque ne hanno data in quantità molto scarsa, mentre gli altri 43 hanno sviluppato H_2S in notevolissima quantità e quasi tutti entro tempo assai breve.

I 13 stipiti isolati dai suini hanno tutti prodotto idrogeno solforato in quantità più o meno notevole — alcuni notevolissima —, all'infuori di due che ne han prodotto soltanto in tracce.

I risultati più interessanti sono quelli che riguardano i 13 stipiti isolati dall'uomo che si è contagiato dai bovini. Questo gruppo era costituito da: 5 ceppi americani, 3 danesi, 4 tedeschi, 1 italiano. Tutti questi ceppi hanno svolto una notevolissima quantità di H_2S, all'infuori del ceppo isolato in Italia, che non ne ha svolta affatto.

I quattro ceppi isolati dall'uomo contagiato dai suini hanno tutti svolto H_2S molto abbondantemente.

Dei 29 stipiti di br. melitensis e paramelitensis si può dire che dopo 24 ore dall'inizio della prova in nessuno si ebbe ancora sviluppo di H_2S, mentre allo stesso tempo i br. abortus, di qualsiasi provenienza fossero, se erano H_2S produttori avevano già intensamente manifestato la loro attività. Seguendo l'osservazione fino a 72 ore ed oltre ho visto che circa una diecina di stipiti hanno dato soltanto quantità di H_2S quasi inapprezzabili (ingiallito solo il margine inferiore della cartina); un paramelitensis e cinque melitensi ne produssero una quantità un po' maggiore ma sempre molto minore di quella che di regola producono gli abortus; i rimanenti non ne produssero affatto.

Le prove sono state ripetutamente compiute, ed ho avuto sempre risultati esattamente sovrapponibili, salvo qualche lievissima differenza nella intensità di produzione di H_2S, dovuta alla più o meno perfetta preparazione del terreno. Dato il numero rilevante degli stipiti con cui le prove sono state condotte, i risultati possono ritenersi sicuri e meritevoli di essere considerati.

Risulta dunque in modo evidente che il metabolismo dello zolfo è molto più intenso nei germi che noi consideriamo come abortus che non in quelli che noi classifichiamo come melitensis; in questi ultimi anzi, nella grande maggioranza dei casi la produzione di H_2S non è apprezzabile.

Le caratteristiche metaboliche di ciascuno stipite non sembra possano subire oscillazioni: esse appaiono anzi stabilissime, nel senso che non sembra facile, stando ai resultati di esperienze che ho tuttora in corso, di fare modificare in più o in meno a questi germi la primitiva capacità a elaborare lo zolfo che è propria di ciascuno stipite. Neppure sembra che tali caratteristiche siano in rapporto con altre particolari del germe stesso: per esempio alcuni br. abortus, leggermente termoagglutinabili e quindi anomali, hanno dato ugualmente su agar fegato un forte sviluppo di H_2S.

Non ho potuto notare maggior produzione di H_2S in stipiti isolati dai suini piuttosto che in quelli isolati dai bovini, come resulterebbe dalle ricerche di Huddleson: se mai gli stipiti suini si sono mostrati, come ho già detto, un po' più irregolari nella quantità di H_2S svolta da ciascuno stipite.

Anche la modalità con cui si manifesta il metabolismo dello zolfo, così come appare dalle prove che ho compiute — massima elaborazione da parte dei brucella delle varietà abortus, minima da parte dei br. melitensis e paramelitensis — soffre però alcune eccezioni: nei 51 stipiti di br. abortus da me esaminati ve ne sono 4 che non hanno prodotto H_2S, e fra i 29 melitensis e paramelitensis 6 dettero un discreto sviluppo di H_2S, sempre però molto inferiore a quello che dànno i br. abortus. Queste eccezioni sono però assai rare, se se ne considera la frequenza rispetto al numero degli stipiti esaminati, e rientrano perfettamente nella categoria delle anomalie di caratteri che ogni specie batterica nelle sue differenti varietà presenta. Va tenuto ad ogni modo conto del fatto che considerando il br. abortus e il br. melitensis come varietà di una stessa specie, con possibilità di passaggio (anche sperimentalmente ottenuto) dalla prima nella seconda attraverso infinite gradazioni, queste eccezioni sono più che giustificate e potrebbero essere rappresentate appunto da stipiti in via di transizione da una varietà nell'altra. Il criterio dunque del differente metabolismo dello zolfo appare per tutte le ragioni sopra esposte assai valido per una differenziazione fra br. melitensis e br. abortus, e dopo ciò assume un particolare valore il comportamento che hanno rivelato sotto questo punto di vista i germi che sono stati isolati dall'uomo infettatosi per contatto con bovini o suini colpiti da aborto epizootico. Questi stipiti, 17 in tutto, all'infuori di uno che fu isolato da un caso di contagio bovino verificatosi in Italia (Modena) hanno mostrato un ricambio dello zolfo così attivo da essere considerati senz'altro per questa qualità come dei tipici br. abortus.

Considerando infatti la lentezza con cui i br. melitensis producono H_2S, e considerando che anche i 6 stipiti di br. melitensis produttori di H_2S ne hanno dato in quantità assai scarsa e non mai paragonabile alla quantità che svolgono dei normali abortus, non è dubbio che gli stipiti di br. abortus umani non possono essere confusi con dei br. melitensis. Questi reperti acquistano speciale interesse per stabilire la vera entità dell'agente eziologico della febbre ondulante da bovini e da suini; e se a base della soluzione di questo problema è stata principalmente posta la ricerca di criteri differenziali fra br. melitensis e br. abortus, si può affermare ora con tutta sicurezza che uno molto buono è dato dalla differente elaborazione dello zolfo che i due germi compiono, e che i germi isolati dall'uomo che si è contagiato dalle vacche o dai suini colpiti da abortus epizootico sono veramente sotto questo aspetto dei br. abortus.

Il *Presidente* dà la parola al Prof. Casagrandi perchè svolga la sua comunicazione:

La maturazione di alcuni virus nelle amebe.

Prof. Casagrandi: L'A. si richiama ad alcune ricerche precedenti rimontanti al 1926 dalle quali risultava la possibilità di coltivare determinati virus nell'interno di *Amebae limax,* fatto che si accompagnava a quel fenomeno che col Barbagallo, studiato nella *E. coli,* denominò « deiscenza nucleare ». Nelle ricerche del 1926 simile comportamento ritrovava anche nel riguardo del vaiuolo.

Ha continuato nelle indagini negli anni successivi ed è riuscito a perfezionare sensibilmente la tecnica delle culture così dette a velo delle Amebe, come egli le ha chiamate in modo da ottenere amebe di grandi dimensioni con ectoplasma molto bene differenziato dall'endoplasma e da poterle aggredire sotto al campo microscopico e nello stesso seguire gli effetti del materiale col quale esse venivano in contatto o che addirittura veniva loro inoculato.

Durante queste ricerche per ottenere amebe giganti, ha trovato che agiscono da agenti stimolanti varie sostanze e particolarmente alcuni estratti vitaminici ed endocrinici e che sono relativamente poche le sostanze che agiscono in questo senso, mentre moltissime sono quelle che si comportano in senso opposto, cioè che diminuiscono e arrestano la vitalità delle amebe.

A parte le ricerche su alcuni batteri acquatili che si sono dimostrati molto adatti ad essere inglobati dalle amebe e nelle medesime a subire evidenti fenomeni di disfacimento, ferma l'attenzione in modo speciale sul comportamento del B. paratifo B e del *Bacterium coli* che ha studiato insieme al B. del tifo, sul quale aveva fermato l'attenzione nei primi lavori riguardanti lo stesso argomento.

Conferma sia a mezzo di osservazioni in campo chiaro, sia a mezzo di quelle in campo oscuro che i batteri studiati, ove si introducano nel corpo amebico in un numero relativamente non grande, in breve scompaiono e che la scomparsa avviene già nello stesso ectoplasma dove si formano dei finissimi accumuli granulari che sono anche facilmente colorabili col liquido di Giemsa, come quelli che si osservano nelle cellule corneali inoculate di virus vaccinico, secondo la tecnica indicata dall'autore nei suoi lavori sui fini reperti granulari nella infezione vaccinica corneale.

Questi ammassi granulari specie con alcuni movimenti dell'ameba per es., durante quelli che potrebbero dirsi di arrotolamento dell'endoplasma nell'ectoplasma, possono raggiungere l'endoplasma stesso dove effettivamente sembra che presentino una elettività per la sede perinucleare, più raramente per la perivacuolare.

Studia il comportamento del nucleo di fronte all'aggressione di queste masse granulari sino alla deiescenza dello stesso. Mette in evidenza la possibilità della formazione di altro nucleo il quale si sposta con facilità nel corpo amebico assumendo i caratteri di nucleo migrante: esso è più difficilmente aggredibile dalle masse corpuscolari su cui ha fermato l'attenzione.

Pare all'Autore di potere accertare che queste masse aumentino di dimensioni e quindi di individui allorchè riescano ad inglobare il nucleo, e che la vita dell'elemento cellulare con questo attacco al nucleo venga compromessa poichè, specialmente delle amebe dove non è possibile di mettere in evidenza altro nucleo, sopravviene la morte e il disgregamento più o meno rapido. L'aggressione della massa granulare al vacuolo non ha lo stesso risultato; anzi si può assistere qualche volta alla scomparsa del vacuolo, forse anche per un fenomeno di deiescenza vacuolare che è generalmente seguita dal formarsi di un altro vacuolo od anche da più vacuoli.

Nelle amebe in cui non è ancora intervenuto il fenomeno dell'automutilazione del nucleo, si può osservare alla periferia dell'endoplasma la formazione di sferule, che si distaccano e diventano autonome, nelle quali sembra come versarsi una parte del materiale fi-

nemente granulare e persino dell'endoplasma. Queste particolari formazioni (che ricordano perfettamente la moltiplicazione per gemmazione delle amebe) sono assai interessanti a studiarsi perchè rivelano dentro di esse la presenza di masse granulari via via in aumento, il che può anche essere legato ad una vera e propria moltiplicazione di questa ultima. Tanto le forme, diremo così prodotto di gemmazione, quanto quelle ordinarie incistidate, possono continuare a presentare lo stesso fino reperto granulare, sempre che esso si mantenga dimostrabile in mezzo all'endoplasma che costituisce in queste forme cistiche tutto il contenuto delle stesse. Certo nelle amebe che si sono riuscite a mantenere con un endoplasma appena differenziato il fenomeno però è ancora percettibile, e induce nel sospetto che queste forme cistiche possono essere portatrici di virus e quindi le amebe intervenire nella diffusione di determinati agenti infettivi in una forma insospettata.

L'A. termina col dire che filtrando colture amebiche in cui si siano prodotti i fatti suaccennati previo disfacimento del corpo amebico, si possono riprodurre in coltura gli stessi germi coi quali si erano eseguiti gli esperimenti, mentre sottoponendo agli stessi trattamenti le patine di colture ottenute su terreni solidi e filtrandole, non ha avuto, almeno sinora, gli stessi risultati. Per cui egli crede che questi nuovi esperimenti parlino, a conferma dei primi, sulla possibilità di una maturazione di alcuni virus batterici nelle amebe sia nella fase di vita vegetativa che in quella cistica: le amebe inoltre assumerebbero così una importanza nella diffusione di alcune infezioni, nuova e di notevole importanza epidemiologica (applausi).

Il *Presidente* prega il Prof. A. Cantani di svolgere la sua comunicazione:

Risultati ottenuti da un nuovo terreno nutritivo pel tifo con l'aggiunta di tripaflavina e da terreni di arricchimento per la emocultura precoce.

Prof. A. Cantani: Il terreno alla tripaflavina per l'isolamento del tifo dalle feci di cui già è stata fatta una comunicazione alla R. Accademia Medico-Chirurgica di Napoli e al Congresso di Fiume nel decorso anno sembra possa essere preso in considerazione per la necessità che si fa sempre più impellente della lotta contro l'infezione tifosa, che ancora dimostra uno sviluppo alcune volte preoc-

cupante, rappresentando per la frequenza dei casi e per la loro mortalità una delle infezioni che maggiormente meritano di essere debellate.

Il mezzo migliore per la lotta antitifica consiste naturalmente sia nella diagnosi rapida per mezzo delle emoculture sia nella possibilità d'isolamento facile dalle feci onde eliminare il pericolo della diffusione della malattia per opera dei portatori di bacilli.

Per l'isolamento facile e più rapido dal sangue ho esperimentato a lungo e con discreto successo un terreno di arricchimento ottenuto nel metodo già da lungo tempo proposto e pubblicato nel *Centralblatt fur Bakteriologie* e confermato da parecchi AA. fra cui il Poppe, consistente nell'adoperare per i terreni nutritivi dei batteri dei glicerolati di qualsivoglia liquido o escrezione organica potendosi con questo mezzo tenere sempre a disposizione delle sostanze nutritive di primo ordine che mantenute in glicerina oltre del pregio della lunga conservabilità acquistano anche, per l'andare del tempo, quello della sterilità.

Sono arrivato così perfino alla fabbricazione di glicerolati di feci che, se usati subito, devono essere anche sterilizzati due o tre volte per 1 ora a 60° C., se conservati a lungo, diventano anche naturalmente sterili, la di cui aggiunta all'agar o al brodo nelle proporzioni di 1/2 cc. su 4-500 di terreno culturale dà ottimi risultati per l'isolamento del tifo direttamente dal sangue.

Sono ricorso recentemente, anche per la possibilità della rapida preparazione di un autovaccino, alla emocultura fatta in latte sterile ed i risultati non sono stati cattivi.

Ben più arduo è il problema dell'isolamento dalle feci ed avendo largamente sperimentato con quasi tutti i terreni nutritivi elettivi già noti cercando con l'aggiunta agli antisettici di sostanze nutritizie favorevoli come il sangue, il rosso d'uovo, la bile, di ottenere un terreno che analogamente a quello di Dieudonné pel colera permettesse un crescimento rapido ed elettivo pel tifo e dirò subito che ciò mi è riuscito solamente con l'aggiunta di iodo alla bile, mentre, aggiungendo sostanze nutritizie troppo favorevoli, come ad esempio il glicerolato di feci anche con contenuto di iodo o di altri antisettici addirittura esorbitante, non si raggiungeva lo scopo perchè il b. coli prendeva subito il sopravvento.

Si è poi nel corso dei miei esperimenti delineato il successo adoperando come antisettico la tripaflavina.

Il terreno che mi ha dato discreti risultati è così composto:

Bile di bue;
Glicerina;
Ana cc. 45;
Joduro di potassio gr. 1;
Sol. di tripaflavina in acqua distillata al 2 % cc. 5-10.
Mescolanza all'agar 1-4.

Le feci sono state direttamente strisciate su piastre con questo terreno.

Altri esperimenti sono stati istituiti facendo permanere per 20 ore nello stesso terreno liquido alla temperatura di 27° C. una quantità di feci del volume di un pisello e poi strisciandole su piastre di agar semplice o tripaflavinizzato o direttamente su terreno di Drigalski.

Ho potuto con questi terreni notare una discreta elettività di crescimento del tifo in confronto del coli e dei coli simili. L'esperimento riesce alla perfezione con culture pure. Con strisciamenti di feci si ottiene qualche volta sviluppo di colonie anche di coli e di coli simili dove il materiale fecale è più abbondante, il che mi sembra dovuto probabilmente alla presenza contemporanea di materiale nutritizio troppo favorevole costituito dai detriti fecali nel punto dello strisciamento.

Gli esperimenti sono stati condotti sulle feci di ben 30 casi di tifo, preferendo sempre la malattia inoltrata, su 20 campioni di feci artificialmente mescolate con culture di tifo e sulle feci di un coniglio cui aveva somministrato per ingestione forti quantità di culture tifose.

Nei 20 campioni di feci con aggiunta artificiale di tifo l'isolamento è riuscito nel 100 % degli esperimenti, così pure nelle feci del coniglio. Nei 30 casi di tifo (dal 3° al 5° settenario) l'isolamento è stato possibile solo in 20 casi, cioè nel 66 %.

I risultati sono stati in conclusione tali da incoraggiare il proseguimento delle ricerche con nuovi controlli e anche con perfezionamenti ulteriori della tecnica.

Il *Presidente* prega il Dott. F. Cantani di svolgere la sua comunicazione:

Su di un nuovo antagonista del carbonchio.

Dott. F. Cantani: Nel corso di alcune esperienze di virulentazione del B. del carbonchio attraverso passaggi nelle cavie, si ebbe a notare come la patogenicità di tale microrganismo risultasse marcatamente compromessa per la causale presenza di altra specie microbica che, isolata mediante emocultura, dimostrava nette qualità antibiotiche rispetto al B. del carbonchio.

Prima di passare alla descrizione delle esperienze eseguite, ricorderò come già da moltissimi AA. (Pasteur, Emmerich, Watsoncheyne e Paulowscki, Zagari, Pavone, Gabribtchewski e Maliutin, Pane, Di Mattei, Bouchard, ecc.), siano stati dimostrati, quali antagonisti del B. del carbonchio in vivo, molti microrganismi (stafilococco, pneumobacillo, b. del colera dei polli, pneumococco, vibrione del colera, piocianeo, b. di Eberth, ecc): è da notare come alcun germe appartenente al gruppo dei pseudotubercolari sia stato finora illustrato quale antagonista od antibiotico del B. del carbonchio.

Gli studi istituiti per l'identificazione della specie microbica casualmente isolata dalla cavia dettero luogo alle seguenti caratteristiche fondamentali:

a) *Caratteri morfologici:* elementi polimorfi, raramente isolati e quasi sempre riuniti in piccoli ammassi irregolari e talvolta in brevi catenelle; nettamente coccobacillari nelle culture di 24 ore tendono alla forma bacillare più pronunziatamente nelle vecchie culture; non hanno rigonfiamenti alle estremità; sono privi di capsule e di ciglia; prendono il Gram ma non sono nè acido nè alcool resistenti.

b) *Culture:* sviluppo aerobico obbligato; cresce rigogliosamente su tutti i comuni terreni di cultura a reazione debolmente alcalina; (p h = 7,4); intorbida il brodo formando nelle culture di più di tre giorni un velo piuttosto spesso alla superficie con tendenza al deposito; su agar forma una patina bianco-madreperlacea a superficie liscia e piuttosto spessa; non liquefa la gelatina e, per infissione, si sviluppa piuttosto stentatamente; non cresce quasi affatto su patata; non fermenta gli zuccheri; non coaugula il latte. L'optimum della temperatura di sviluppo è a + 37° C.; resiste poco ai comuni disinfettanti ed al calore; non secerne tossine solubili attive.

c) *Azione patogena:* è stata studiata sulla cavia e sul coniglio. Sulla cavia l'azione patogena è spiccata e si rileva con alterazioni pseudotubercolari marcate specie del fegato e della milza; sperimentalmente l'inoculazione sottocutanea di piccole quantità determina la morte dell'animale in 24-48 ore con grave setticemia. Nel coniglio l'azione patogena è molto meno marcata e, sperimentalmente, l'animale resiste bene all'inoculazione anche di quantità decuple di quelle usate per la cavia e muore soltanto dopo parecchi giorni con setticemia: notevole è la tendenza a formare ascessi caseosi-purulenti limitrofi al punto dell'inoculazione e la morte dell'animale è costantemente preceduta da una caratteristica paralisi del treno posteriore.

Per tutti i caratteri brevemente illustrati credo che questa specie batterica possa essere classificata tra i pseudotubercolari pur non potendo essere identificata esattamente con alcuna delle varietà già descritte poichè, pur avendo la maggior parte dei caratteri comuni al coccobacillo di Malassez e Vignal ne deve essere differenziata per alcuni caratteri e specie per la paralisi che determina nel coniglio, caratteri comuni e caratteri differenziali esistono pure nella nostra specie e in quelle isolate da Du Cazal e Vaillard, da Preiz-Nocard, da Courmont, Sabrazés, De Blasi, Cagnetto, Galli-Valerio ed altri AA.

Tralasciando le esperienze in vitro istituite per lo studio della capacità antibiotica della specie microbica isolata che per brevità indicherò col n. 53, riassumerò brevemente alcuni dati delle esperienze istituite in vitro per dimostrare la capacità antagonista.

Sulla cavia inoculazioni sottocutanee di 53 e di carbonchio provocano rapidamente la morte dell'animale ed i reperti necroscopici (come le ricerche batteriologiche) dimostrano la morte dovuta all'azione del 53: dal sangue non si riesce che di rado ad isolare il carbonchio e sempre con nettissima prevalenza del 53. Nel coniglio gli esperimenti sono stati più diffusi e vertono su di un numero complessivo di 52 animali. Stabilita e controllata di poi ripetutamente la dose minima mortale dei varii ceppi di carbonchio in uso — scelti tra quelli non troppo spiccatamente virulenti — ho usata almeno una dose doppia e poichè conigli di due chilogrammi circa morivano in 40 ore con l'inoculazione sottocutanea di 0,05 cc. di brodocultura di carbonchio di 48 ore di sviluppo ho usate dosi non minori di 0,1 cc. Questa serie di esperienze ha data una riprova in vivo del potere antibiotico del 53: con inoculazioni sottocutanee di piccole quantità di 53 sono riuscito a tenere in vita animali inoculati con dosi sicu-

ramente mortali di carbonchio fino alla dose di 0,5 cc. con la quale peraltro la morte dell'animale è avvenuta dopo 25 giorni. Per queste esperienze, oltre le brodoculture di 48 ore di sviluppo di 53 e di carbonchio, ho usati anche brodofiltrati e sospensioni di 53 sterilizzate col calore. I migliori risultati sono stati costantemente ottenuti con l'uso di brodoculture di 48 ore non sterilizzate e con l'inoculazione contemporanea nello stesso punto delle due specie microbiche. Ad eccezione dei controlli inoculati con solo carbonchio, ripetuti con notevole larghezza, la morte era sempre preceduta dalla costante e caratteristica paralisi del treno posteriore e le lesioni anatomopatologiche, come i reperti batteriologici, erano da mettersi in relazione con l'azione del 53.

Per concludere queste note sull'antagonismo della specie microbica isolata dirò che, se da una parte l'esistenza di una capacità antagonista rispetto al carbonchio è risultata in modo evidente, d'altra parte sarebbe troppo difficile tentare una spiegazione generale del fenomeno poichè, escludendosi a priori che si possa trattare di azioni inibitrici proteiniche aspecifiche, troppo grande è come dianzi ho ricordato il numero dei microbi che hanno dimostrato tale antagonismo rispetto al carbonchio e quindi mi pare logico pensare che l'azione antagonista del gruppo microbico elencato debba attribuirsi in vitro alla produzione di speciali enzimi che in vitro ecciterebbero localmente, con processi di chemiotassi positiva, i poteri di difesa dell'organismo: si può quindi soltanto attribuire ad una azione generale e non particolare questo meccanismo di azione del gruppo microbico descritto dai varii AA. Questa ipotesi verrebbe anche ad essere convalidata dal fatto osservato anche da me in modo sicuro e che cioè i migliori risultati nella dimostrazione delle capacità antagonistiche di una data specie batterica si raggiungono quando l'inoculazione si fa contemporaneamente e nello stesso punto per le due specie microbiche non attenuate al calore.

Il *Presidente* dà la parola al Dott. P. Gori perchè svolga la comunicazione:

Alcune ricerche sul virus del vaiuolo aviario.

Dott. P. Gori: Ho avuto in questi ultimi tempi occasione di osservare una epizoogia di difterite aviaria in un piccolo allevamento di piccioni di quella varietà detta in Toscana Pavoncelli.

Di 22 piccioni di cui questo allevamento si componeva, 14 pre-

sentarono successivamente e in diverso grado segni clinicamente sicuri di infezione difterica.

Con materiale difterico prelevato da essi mi fu possibile provocare con semplice innesto alla Jenner, la comparsa di manifestazioni a carico della cute in piccioni nuovi, di passare cioè dalla forma difterica alla forma epiteliomatosa o vaiuolosa. Trattavasi quindi di quella « difterite aviaria » che ha per agente causale un virus filtrabile identificabile secondo le recenti vedute a quello dell'epitelioma contagioso o vaiuolo aviario.

Uno fra i piccioni di questo allevamento spontaneamente difterico mostrava, oltre questa lesione, una seconda manifestazione di particolare interesse. Nella parte bassa del petto dove un leggero diradamento delle piume richiamava l'attenzione, si nota a carico della cute un arrossamento e una lieve tumefazione punteggiata dagli elementi tipici del vaiuolo aviario. Le tumefazioni hanno un colorito giallo sporco. La manifestazione vaiuolosa appariva impiantarsi intorno ai margini di una piccola ferita in via di cicatrizzazione.

Mi sembrò ragionevole il supporre che in questo piccione (la lesione difterica sembrava già antica) il virus avesse incontrato in questi punti della cute una zona favorente il suo attecchimento e così, nello stesso soggetto recante la lesione difterica si fosse manifestata la lesione vaiuolosa.

Quest'osservazione mi suggerì alcune prove di cui riassumo i risultati:

a) se si prendono piccioni con manifestazioni difteriche iniziali è possibile provocare in essi, con la semplice scarificazione, la comparsa a carico della cute di manifestazioni vaiuolose;

b) anche l'inverso, sebbene offra qualche difficoltà d'ordine pratico, è possibile, cioè scarificando le mucose della bocca e della retrobocca a piccioni in cui si sia iniziata una manifestazione vaiuolosa, si ha comparsa, a carico delle mucose e nei punti lesi o in prossimità di essi, di piccoli noduli caratteristici dell'infezione difterica.

c) e ancora, sia in piccioni difterici che vaiuolosi in via di guarigione il risultato di tali tentativi è costantemente negativo, il che è presumibilmente dovuto all'essersi già determinato uno stato di immunità, il quale è dimostrabile perchè rende infruttuosi i tentativi di reinfezione sia diretta che crociata e permette solo qualche volta la comparsa di manifestazioni fugaci e abortive.

Considero queste prove come inizio di una più completa serie di indagini ma ho riferito su di esse ritenendole modesto contributo

alla tesi che considera il vaiuolo aviario e la difterite degli uccelli come manifestazioni cliniche dissimili macroscopicamente e diversamente localizzate di una infezione etiologicamente identica e all'altra tesi che tende a classificare il virus diftero-vaiuoloso degli uccelli in quel gruppo non ancora ben definito di virus biotropi, del tipo del virus vaccino, di quei virus cioè con affinità assai strette per i tessuti in via di rigenerazione attiva.

Il *Presidente* dà la parola al Dott. Trivellini perchè svolga la sua comunicazione:

Ricerche sui microrganismi termofili.

Dott. Trivellini: Col nome di schizomiceti termofili si sono volute denominare certe specie microbiche le quali hanno la proprietà di vivere e svilupparsi ad elevate temperature.

Dopo che Miquel nel 1879 riuscì ad isolare il primo schizomiceto termofilo altri AA. si interessarono ben presto dell'argomento riuscendo ad isolare dai più svariati campioni in esame un buon numero di questi germi.

I primi studi sui termofili vennero fatti sulle acque termali e Karlinki e Teich riscontrarono tali germi nelle acque termali di Edlige, viventi a 51°, 58°, 64° C.

In Italia Benignetti ha descritto un anaerobio capace di svilupparsi a 65°-75° C. isolato dalle acque termali di Acqui.

Termofili vennero descritti da Mc. Faydean, Blaxall, Gorini, Oprescu, Pretti, Sames, ecc. i quali isolarono tali microrganismi dalla terra, dal latte, dal pulviscolo, dall'acqua e Tsiklinsky, in un lavoro pubblicato nel marzo 1913 ha portato un notevole contributo alla flora intestinale dell'uomo, studiandola sotto questo punto di vista.

Le ricerche di Tsiklinsky effettuate su 48 soggetti, portano alla conoscenza di 20 specie di microrganismi fra i quali 18 batteri e 2 streptotricee. Fra i batteri 12 sono termofili assoluti e 9 facoltativi. I termofili assoluti (ad eccezione di uno solo) sono aerobi obbligati ed i termofili facoltativi sono aerobi facoltativi.

Bruini ha esaminato le feci di 20 soggetti riscontrando 15 specie di microrganismi fra le quali 10 forme a bastoncino e 5 streptotricee. Sei sono batteri termofili assoluti e 9 facoltativi. Tanto i termofili assoluti quanto i facoltativi sono aerobi assoluti.

Recentemente Damon e Feirer hanno descritto 4 termofili anaerobi obbligati viventi alla temperatura di 37°-55° C.

Pure Hussing e Hammer (1927) hanno isolato un bacillo (Bacillus colidolactis) che si sviluppa a 55°-75° C.

Eseguendo ricerche comparative sulla flora intestinale in individui normali ed in individui affetti da svariate forme morbose, pure io ho voluto interessarmi di questo argomento prendendo in esame soggetti degenti nella Clinica Chirurgica. Nel procedimento delle mie ricerche ho esperimentato in condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi.

Sono riuscito ad isolare un buon numero di germi termofili, alcuni aerobi assoluti ed altri anaerobi assoluti e facoltativi, fra i quali i germi che in questa relazione sommariamente descrivo per le particolarità culturali, fermentative, e limite di temperatura di sviluppo che li distinguono dalle specie che ho potuto riscontrare nella letteratura.

Bacterium 1° — Isolato dalle feci di un paziente affetto da ulcera gastrica; a forma di bastoncino Gram negativo in giovani culture, diventa in seguito Gram positivo. Mostra in goccia pendente rapidi movimenti. Non sporigeno, sprovvisto di ciglia e di capsula.

Si sviluppa ottimamente nei comuni terreni colturali preferendo l'agar sangue. Non si sviluppa su patata. Anaerobio facoltativo a 37° C. aerobio assoluto a 56° C. Non produce indolo, nè scatolo. Negativa la ricerca nelle culture in pieno sviluppo dell'idrogeno solforato, triptofano indolo, nitriti e mercaptano. Per lo sviluppo preferisce il mezzo alcalino.

La temperatura minima di sviluppo è di 32° C., massima 80° C., ottima 56° C.

Muore in dieci minuti a 110°-120 C. Fermenta con produzione di acido e non di gas a 56° C. l'amigdalina, il mannosio, l'inosite, il raffinosio, il galattosio, la mannite, il glucosio e l'arabinosio. Non fermenta l'adonite, la dulcite, l'isodulcite, l'amido, la salicina, il maltosio, la sorbite, il fruttosio, il nutrosio, l'eritrite, l'inulina. Non coagula il latte. Fermenta pure a 37° i saccaridi fermentati a 56° C. eccetto il raffinosio. A 80° fermenta solo l'inosite, il levulosio, la salicina, il saccarosio.

Non è patogeno per la cavia e per il coniglio; uccide alla dose da mezzo a 4 c.c. di sospensione di 3 ansate di patina batterica in 10 c.c. di soluzione fisiologica, il topo (Mus Musculus). Il siero di sangue dell'animale (coniglio) trattato mediante iniezioni sottocute di sospensione batterica ha dato un tasso di agglutinazione di 1/500.

Bacterium 2° — Venne isolato 4 volte dalle feci di ammalati affetti da ulcera duodenale e da cancro dello stomaco. Si presenta sotto forma di bastoncino non sporigeno, immobile, Gram positivo anaerobio facoltativo si sviluppa a 37°-55° C.

Produce idrogeno solforato. Muore in 10 minuti a 110° C. Fermenta a 37° con produzione di acido e non di gas il lattosio, il saccarosio, il galattosio, ed il glucosio. A 55° fermenta con produzione di acido e di gas il saccarosio, il galattosio ed il glucosio. Non ha alcuna azione sugli altri saccaridi, non coagula, nè acidifica il latte. Non è patogeno per la cavia, nè per il coniglio nè per il topo.

Bacillus 3° — Isolato due volte dalle feci di individui normali; a forma di bastoncino Gram-negativo, in giovani culture, diventa in seguito Gram positivo; immobile, sporigeno con spore terminali, sprovvisto di ciglia e di capsula. Anaerobio facoltativo a 37° aerobio assoluto a 56°; temperatura ottima 56°, minima 30°, massima 70°. Fermenta con produzione di gas e non di acido a 56° il lattosio, il saccarosio, il galattosio ed il glucosio. Acidifica senza produzione di gas a 37° l'arbutina, l'inosite, il mannosio, il saccarosio ed il glucosio. Non ha alcuna azione fermentativa a 70° C. Non è patogeno per la cavia nè per il coniglio nè per il topo.

Bacterium 4° — Venne isolato una volta sola dalle feci di un paziente affetto da colite cronica. Gram-negativo mostra in goccia pendente rapidi movimenti. *Anaerobio assoluto* a 56° e 37°. Si sviluppa producendo gas in spieciali terreni solidi glucosati. Fermenta a 37°, producendo gas e acido, il glucosio, il mannosio, la mannite, il fruttosio, saccarosio. Fermenta a 56° con produzione di gas e non di acido il raffinosio, l'arbutina, l'inosite, il galattosio ed il glucosio. Temperatura minima 35°, massima 60° ottima 56°. Muore a 100° in dieci minuti.

Non è patogeno per la cavia, nè per il coniglio, nè per il topo.

Bacterium 5° — Isolato 3 volte dalle feci di individui affetti da ulcera duodenale e cancro dello stomaco, a forma di bastoncino Gram negativo. Mostra in goccia pendente rapidi movimenti; non sporigeno. Anaerobio facoltativo a 37° e a 56° C. Non produce indolo, nè scatolo. Non produce idrogeno solforato, nè mercaptano. Temperatura minima di sviluppo 34° massima 65°, ottima 56°.

Fermenta a 37° con produzione di acido e non di gas il mannosio, l'inosite e il raffinosio; a 56° fermenta con produzione di acido e di gas il glucosio, il galattosio, il saccarosio; con produzione di acido e non di gas il mannosio, l'inosite e il raffinosio. Non ha alcuna azione fermentativa a 65° C. Non è patogeno nè per la cavia, nè per il coniglio, nè per il topo.

Bacterium 6° — Isolato due volte dal contenuto di cistifellee in ammalati affetti da colecistite calcolosa.

A forma di bastoncino Gram negativo, immobile, non sporigeno, si sviluppa bene tanto a 37°, che a 56° C. Temperatura minima di sviluppo 30° C., massima 60°. Produce indolo, non produce idrogeno solforato, triptofano, nitriti e mercaptano. Fermenta tanto a 37° che a 56° il mannosio, il glucosio, il levulosio, l'arbutina, il galattosio, il saccarosio e la dulcite; con produzione di acido e non di gas. Anaerobio facoltativo, non coagula il latte e non è patogeno nè per la cavia, nè per il coniglio nè per il topo.

Bacterium 7° — Isolato due volte dal lume appendicolare in ammalati sottoposti ad appendicectomia, Gram negativo a forma di bastoncino si sviluppa tanto a 37° che a 56° C. Temperatura minima a 30°, massima a 70°. Immobile, non sporigeno, nè provvisto di ciglia e di capsula. Anaerobio facoltativo non produce indolo. Fermenta tanto a 37°, che a 56° con produzione di acido e di gas il mannosio, l'arbutina, il saccarosio, il galattosio, il glucosio, e l'arabinosio non ha alcuna azione fermentativa a 60°. Muore a 100° C. in 5 minuti. Non è patogeno per la cavia, nè per il coniglio, nè per il topo.

Oltre a questi Schizomiceti che sommariamente ho descritto e che ancora non ho potuto classificare, altri ne ho isolati dalle feci di individui normali ed affetti da svariate forme morbose i quali per le loro proprietà colturali, fermentative e limite di temperatura di sviluppo ho riscontrato simili ad altri termofili già descritti dagli AA.

Così dall'esame delle feci di individui normali furono isolate cinque specie di termofili, due delle quali simili a quelle descritte dal Bruini e tre dal Tsiklinsky sebbene nel confronto di queste, mi siano mancate le prove fermentative, non adoperate da questi autori. Venne pure isolato dalle feci un termofilo, sporigeno, Gram positivo anaerobio obbligato, immobile, sviluppantesi alla temperatura di 56° C. che per le sue proprietà di fermentare con produzione di acido e di gas la mannite, l'inulina e con produzione di acido e non di gas l'amido, il saccarosio e non il glucosio il lattosio ed il maltosio si può ritenere simile al *Clostridium thermoacidophilum* descritto recentemente da Damone Feirer.

Ho inoltre in corso ricerche riguardo all'eventuale azione che questi germi termofili potrebbero svolgere nell'intestino in simbiosi con la comune flora batterica.

Seduta antimeridiana del 23 Marzo 1930

Presiede il Prof. D. Ottolenghi.

Il *Presidente* prega il Prof. A. Muggia di svolgere la sua relazione:

La etiologia delle malattie esantematiche dell'infanzia.

Prof. A. Muggia: Scarlattina. — L'etiologia delle malattie esantematiche è argomento che ha in ogni tempo destato l'interesse degli studiosi delle discipline mediche di tutto il mondo; e ciò ben si comprende ove si ponga mente all'importanza epidemiologica e sociale di queste particolari forme morbose, e all'influenza che la scoperta dell'agente patogeno di una malattia infettiva potrebbe esercitare nei riflessi della diagnosi, delle cure e della profilassi della malattia stessa.

Tra le malattie esantematiche la scarlattina è certamente quella che maggiormente ha attirato l'attenzione dei ricercatori e ha suscitate appassionate discussioni. È certo impossibile raccogliere particolarmente l'immensa mole di lavori aventi per tema l'etiologia della scarlattina; mi limiterò quindi ad accennare alle principali indagini distinguendo le ricerche secondo lo schema segnato nell'accurata monografia di Di Cristina e Caronia (*La Pediatria*, Archivio, vol. I, fasc. I, 1925) in quattro gruppi: 1° i protozoi nell'etiologia della scarlattina; 2° gli schizomiceti nell'etiologia della scarlattina; 3° la scarlattina quale sindrome anafilattica; 4° i virus filtrabili nell'etiologia della scarlattina.

1° *I protozoi nell'etiologia della scarlattina.* — Nel periodo che va dal 1900 al 1914 i reperti di protozoari nella scarlattina sono andati moltiplicandosi; valenti Autori (Mallory, Duval, Siegel, Pro-

wazek, Gamaleia, ecc.) ne hanno sostenuta l'etiologia protozoaria; dalla già ricordata monografia di Di Cristina e Caronia traggo i principali dati bibliografici, affermando subito che questi elementi non hanno ormai alcuna seria consistenza.

Pfeiffer (1891) descrisse plasmodi simili a quelli della malaria nel corpo degli eritrociti, in successive ricerche riconobbe il suo errore; più tardi illustrò formazioni endocellulari nello strato lucido della pelle; piccole sfere colloidali isolate o ammucchiate nel protoplasma delle cellule o libere nel tessuto.

Siegel nel sangue di scarlattinosi e di conigli inoculati con squame, speciali formazioni ovalari, rinfrangenti, munite a volta di flagello, lunghe da 0,5 a 1 μ, mobili, indicate con il nome di Citoryctes scarlatinae.

Mallory (1904) trovò il suo « Cyklasterion scarlattinale » in sezioni della pelle di scarlattinosi entro e tra le cellule epiteliali dell'epidermide, nei vasi linfatici e nelle lacune del corion, caratterizzato da corpuscoli in forma diversa da 2 a 7 μ, colorabili in bleu scuro col bleu di metilene. Duval nel 1905 ebbe analogo reperto nel contenuto di vescicole ottenute con l'ammoniaca; Prowazek (1906) descrisse forme uguali a quelle di Mallory contenenti inclusioni di colore più intenso e corpuscoli e manubrio; in stadi successivi queste forme si segmenterebbero dando luogo a formazione a crisantema, contenenti sempre nel loro centro un corpuscolo di colorito più scuro. Queste formazioni vennero considerate come prodotti di reazione cellulare al virus specifico e rappresentato nelle granulazioni più intensamente colorate: sono i famosi clamidozoi (virus contornato da un mantello), reperto questo confermato successivamente da Bernhardt.

Analogo valore ai precedenti hanno i reperti di Gamaleia (1908): il Chrysantozoon scarlatinae, venne trovato nella pelle, nel sangue, negli organi interni e talvolta nel protoplasma dei polinucleati.

Paschen (1909) esaminato la cute di cadaveri di scarlattinosi trovò in alcuni casi elementi simili a quelli di Mallory e negli strisci di essudato delle tonsille, all'inizio della malattia, piccolissimi granuli rotondi.

Höfer (1911) nelle cellule degli organi di scarlattinosi inclusioni risultanti di forme rotonde ed ovali di varie grandezze, aderenti al nucleo, meno colorate del rimanente protoplasma, contenenti uno o due granuli centrali.

Cantacuzène trovò negli strisci di ghiandole linfatiche, di milza,

di fegato, di sangue, dei corpiccioli rotondi rossi alla periferia e con un punto centrale od eccentrico violetto.

Döhle (1912) segnala la presenza nel sangue circolante degli scarlattinosi di corpiccioli inclusi nei leucociti polimorfonucleati consistenti in granuli di forma e grandezza varie e li interpretò come parassiti; Cannata li rinvenne nella Leishmaniosi e lo stesso Döhle li rinvenne poi in altre malattie.

Amato (1903) richiamò l'attenzione su nuove inclusioni leucocitarie, costantemente ed esclusivamente trovate nel sangue di scarlattinosi e presentantesi sotto forma di corpiccioli rotondeggianti o leggermente ovalari, di colore azzurro tenue, con uno o più granuli rosso vivo nel loro interno. Successivamente l'Amato (1921-924) affermò di esser riuscito ad ottenere in cultura corpi granulosi colorabili in rosso e analoghi ai granuli cromatinici delle inclusioni leucocitarie. I corpi di Amato sono stati rinvenuti da Cartia e Rapisardi in numerose altre malattie: al contrario Tron, Veronesi, Pauli, Hoeppli, Guardabassi non le hanno mai rinvenuti in malattie diverse dalla scarlattina e dal morbillo e Trambusti solo nella scarlattina e principalmente nei primi giorni della malattia.

2° *Schizomiceti nell'eziologia della scarlattina.* — Tra le più antiche ricerche si sogliono ricordare quelle di Hallier che nel 1869 descrisse un microorganismo coltivabile dal sangue degli scarlattinosi e indicato con il nome di « tilletia scarlatinae ». Si può ancora accennare alle ricerche di Coze e Feltz, di Tschamer, di Klamann, che isolarono micrococchi dalle squame, dal sangue, dal muco faringeo. Successivamente Class e Cjajcowsky isolarono diplococchi: Jamerson e Edington un bacillo. Per nessuno di questi germi esistono certo prove di specificità.

È a tutti noto che nelle localizzazioni faringee degli scarlattinosi in tutti i processi purulenti (ghiandole linfatiche, orecchio) e così pure nel sangue e negli organi dei cadaveri di individui venuti a morte per scarlattina, spesso si possono trovare (secondo Moser nel 60 % dei casi) streptococchi in cultura pura. Loeffler per il primo ha messo in rilievo tale reperto che doveva essere di base alla teoria streptococcica della scarlattina. La presenza dello streptococco nel sangue, nel faringe, nelle orine, nel liquido cefalo-rachideo nei malati di scarlattina è stata segnalata da una schiera innumerevole di ricercatori; alcuni considerano gli streptococchi come i veri agenti specifici della malattia e pensano che lo streptococco scarlattinoso

costituisce una specie a sè e che si avvicini alle altre specie di streptococco solo dal punto di vista morfologico (Baginski, Clien, Babès, Soerensen, Kurt, D'Espine, Closs, Moser, Gabritschewsky, Schleissner, Tunnicliff ecc. ecc.) altri, e sono la maggioranza, considerano tale germe come l'agente ordinario delle complicazioni, che viene ad aggiungersi secondariamente ad un agente ancora sconosciuto (Loeffler, Heubner, Bardt, Freudenberg, Fraenckel, Dopter, Dutot, Klimenko, Schick, v. Pirquet, Comba, Giarrè, ecc.).

Numerose le prove dirette a stabilire la specificità dello streptococco; ma le reazioni sierologiche, i tentativi di vaccinazione e di sieroterapia, diedero risultati incerti e contradditori (Sommerfeld, Hasenknopf, Dopter, Zelensky, Moser, Gabritschewski, ecc.).

La maggioranza di questi Autori era d'avviso che questo streptococco fosse analogo allo streptococco della eresipela, dell'infezione puerperale, ecc.; altri invece che si trattasse di uno streptococco particolare: dopo lo streptococco conglomeratus di Kurth sorse così quello scarlattinoso di D'Espine e quello emolitico di Zungmann (1912).

In questi ultimi anni l'etiologia streptococcica della scarlattina pareva definitivamente tramontata, e questi germi non erano considerati che come agenti d'infezioni secondarie e associati al virus ignoto. Le cose erano a questo punto, quando, alla fine del 1921 in Italia Di Cristina annunciava di esser riuscito ad isolare dal sangue e dal midollo osseo, facendo uso di terreni catalizzatori del tipo Tarozzi-Noguchi in stretta anaerobiosi un germe molto piccolo 0,2-0,4 micron rotondo o leggermente ovalare, isolato o riunito a coppie, Gram-positivo. L'inoculazione per via endovenosa di queste culture a giovani conigli o a cavie provocherebbe un quadro morboso simile a quello provocato con l'inoculazione di sangue di scarlattinoso. L'inoculazione di colture attenuate a bambini che mai avevano avuto la scarlattina conferirebbe l'immunità. L'osservazione microscopica di strisci del midollo osseo dei malati in periodo di esantema e degli organi (fegato, milza, rene) di animali sperimentalmente infettati permetterebbe di osservare i medesimi microorganismi ottenuti attraverso culture. Nel 1923 Caronia e Sindoni confermavano le ricerche del Di Cristina e dichiaravano di essere riusciti a provocare la scarlattina tipica in 5 bambini convalescenti di morbillo con inoculazione di colture di recente isolate e arricchite a mezzo di parecchi passaggi. Le reazioni sierologiche comuni (agglutinazione, deviazione del complemento, indice opsonico) praticate sia con il siero

di ammalato o di convalescente, naturalmente o sperimentalmente infettati, sia con il siero di animali infettati sperimentalmente dànno reazioni positive in presenza di antigene di microbi in coltura. Le reazioni sierologiche e le applicazioni immuno-profilattiche confermerebbero la specificità del microorganismo isolato. Questo microorganismo traverserebbe certamente nel corso del suo ciclo vitale una fase ultramicroscopica, perchè agli Autori sarebbe riuscito di coltivarlo anche dal filtrato di muco faringeo e dal filtrato di coltura. Queste ricerche ebbero qualche conferma: così il Nasso e Auricchio costantemente isolarono il germe di Di Cristina da malati di scarlattina. Vitetti lo isolò dal muco nasale, Ritossa dall'orina durante il periodo esantematico o desquamativo, Nastasi in molti casi di nefrite postscarlattinosa, Catteruccia dal liquido cefalo-rachidiano.

Zlatogoroff, Kandriavtzeva e Palante negli analoghi terreni riconobbero l'esistenza di due categorie di granulazioni: le une indifferenti, inerenti al mezzo provenienti dall'autolisi dell'organo, le altre a forma di diplococchi molto piccole da 0,05 a 0,1 μ. Questi ultimi si riscontrano solo nei terreni seminati con materiale scarlattinoso e si trapiantano in serie (11 trapianti). I diplococchi non si sviluppano nei trapianti se scaldati a 60°; l'inoculazione di queste colture ai conigli anche dopo 5-6 passaggi riproduce il quadro tipico della scarlattina sperimentale.

Secondo questi ultimi Autori il virus filtrante della scarlattina darebbe in coltura delle forme visibili, ad una fase, di diplococchi che non sono derivati dallo streptococco, ma bensì organismi autonomi. Altri ricercatori non confermarono i risultati di Di Cristina, del Caronia e collaboratori. Così negative sono rimaste le ricerche culturali di Vernoni, di Revelli e altri. Poco probative sono considerate da Casagrandi le prove sierologiche e in specie quelle di deviazione del complemento, perchè praticate con materiale culturale ricco di diversi lipoidi.

Brokmann, Feggin, Hirszfeld, Meyzner e Przesmycki hanno esaminato i rapporti tra il vaccino scarlattinoso di Caronia e il mezzo Tarozzi-Noguchi di fronte a vari ceppi di streptococco emolitico isolato da scarlattinoso. Quattro conigli trattati con vaccino antiscarlattinoso di Caronia diedero un siero agglutinante gli streptococchi scarlattinosi sino a 1/640-1/2560. Il siero di due conigli immunizzati con il terreno Tarozzi-Noguchi, rimasto 7 giorni a 37°, agglutina gli streptococchi al medesimo tasso. Il siero di due conigli, vaccinati con l'ascite del terreno Tarozzi senza organo non

agglutina alcun streptococco scarlattinoso. Gli Autori hanno inoltre immunizzato 14 soggetti con Dick positiva, con il vaccino antiscarlattinoso di Caronia e 4 soggetti con il terreno Tarozzi-Noguchi con organo autolizzato. In questi ultimi la reazione di Dick positiva prima della inoculazione è diventata negativa dopo l'immunizzazione e così negli 8 soggetti immunizzati con il vaccino Caronia. Il siero di questi 12 soggetti (8 + 4) agglutina gli streptococchi emolitici al tasso di 1/160-1/640-1/1280. Il siero di coniglio e il siero umano erano assolutamente privi prima dell'esperienza di anticorpi degli streptococchi scarlattinosi; il mezzo Tarozzi con organo sarebbe quindi capace di provocare la produzione di anticorpi per gli streptococchi emolitici (anticorpi non specifici).

Mentre si diffondevano in Europa le notizie delle ricerche del Caronia in accordo in parte con le ormai da tempo dimostrata filtrabilità del virus scarlattinoso, in America (1923) si tornava all'idea della specificità dello streptococco nella genesi della malattia.

Nel 1923 George H. Dick e la signora Gladys Dick riferivano di aver isolato costantemente da scarlattinosi nei primi giorni di malattia degli streptococchi emolitici, dimostranti particolare, se pure non univoco, comportamento nelle prove fermentative: il 14 % degli stipiti isolati fermenta con produzione di acido la mannite, l'86 % non fermenta questo idrato. Strofinando culture di questo germe nelle fauci di alcuni volontari gli Autori ottennero (indipendentemente dal carattere fermentativo rispetto alla mannite), in due casi la comparsa di una tipica forma di scarlattina; con l'introduzione sottocutanea di siero e di sangue in toto di scarlattinosi non produssero mai questa forma morbosa; parimenti risultato negativo ebbero le inoculazioni sottocutanee e faringee di filtrati di essudati tonsillari di scarlattinosi. Gli Autori conclusero da queste ricerche che il virus scarlattinoso non si trova nel sangue e non è filtrabile.

Intradermoreazioni con filtrati di culture di questi germi alla diluizione di 1: 1000 e alla dose di cc. 0,10 (analogamente alla reazione di Schik) permetterebbero di svelare la recettività o meno degli individui, provocando nella pelle dei soggetti sensibili alla scarlattina, una zona eritematosa (reazione di Dick) accompagnata o no da edema, mentre effetto nullo si avrebbe nei convalescenti ed in genere negli individui immuni da scarlattina: la reazione positiva veniva inibita dal siero di convalescente e dal siero di cavallo trattato con forti dosi di filtrati di coltura di streptococchi e ciò dimostrerebbe esservi nel siero presenza di una antitossina specifica. I coniugi Dick

osservarono ancora che i filtrati di culture in brodo di streptococchi emolitici scarlattinosi provocano, inoculati sotto cute, una eruzione scarlattiniforme, accompagnata da vomito e febbre. Tali fenomeni compaiono entro le prime 48 ore. La mancanza di un periodo di incubazione e la rapida scomparsa dei sintomi fanno ritenere che essi siano dovuti alla presenza di una tossina anzichè di un virus contenuto nei filtrati di brodocultura.

La somiglianza fra i sintomi provocati dalla tossina streptococcica e sintomi della scarlattina e l'assenza del virus nel sangue dei malati, ha fatto ritenere ai Dick essere la scarlattina malattia locale con fenomeni generali prodotti dalle tossine secrete e messe in circolo da particolari streptococchi emolitici esistenti nelle fauci. Con questa ipotesi si verrebbe a spiegare il perchè dell'immunità conferita quasi sempre al paziente da una pregressa scarlattina: tale immunità sarebbe esclusivamente antitossica e non antimicrobica. La analogia tra la difterite e la scarlattina sarebbe quindi perfetta.

I Dick tentarono di applicare alla profilassi e alla terapia i risultati delle loro ricerche, praticando vaccinazioni nei casi esposti al contagio e curando i malati con inoculazioni di sieri antitossici ottenuti dal cavallo mediante iniezioni di dosi crescenti di tossine di streptococchi emolitici scarlattinosi.

Ciascuna di queste affermazioni, lungi dall'essere universalmente accettate, ha formato argomento di discussione e di numerosissime ricerche, sia cliniche che sperimentali (rimando per i dettagli alle complete riviste critico-sintetiche di Tron, di Elisa Morelli, *Boll. Ist. Sieroterapico Milan.*, 1926-1927, e di Pollitzer, *La Presse Médicale*, n. 104, 1924).

Riassumendo si può dire che gli streptococchi emolitici isolati dal faringe di scarlattinosi non hanno carattere di specificità; essi sono germi comuni e assai diffusi e non presentano una netta differenzazione da streptococchi agenti casuali di altre malattie. Non costanti le prove fermentative; incerto il potere emolitico, non concordi i risultati ottenuti con l'agglutinazione, la prova di saturazione delle agglutinine, la deviazione del complemento, la neutralizzazione delle tossine. Eagles ad esempio ha potuto neutralizzare tossine prodotte da streptococchi dell'erisipela con siero di cavalli immunizzati con streptococchi scarlattinosi. Singer e Kaplan hanno ottenuto neutralizzazioni crociate delle tossine dell'erisipela con siero antiscarlattinoso (canvalescente, cavallo immunizzato) e viceversa.

Anche sulla reazione di Dick non sono mancati i pareri di-

scordi; alcuni hanno notato carattere di incostanza e variabilità nello stesso individuo (Gerbasi, Seligmann) altri l'hanno riscontrata costantemente negativa (Ciuca e Manolin), altri che non era sempre indice di refrattarietà alla scarlattina (Belikoff) e poteva variare per ragioni indipendenti dall'immunità antiscarlattinosa. Molti altri ricercatori non hanno confermato l'assoluta immunità dei soggetti Dick negativi e la costante refrattarietà all'intradermoreazione di tossina streptococcica dei soggetti immuni (Tron - Baccichetti).

Di recente Lees, Brookmann e Mayzner hanno osservato frequentemente Dick negativa nei malati di scarlattina durante i primi giorni.

D'altra parte il fenomeno di estinzione di Schultz-Charlton potrebbe esser dato anche da sieri di soggetti presentanti una reazione di Dick negativa (Fraenkel); e così pure per la sieroterapia, i buoni risultati ottenuti da alcuni ricercatori, furono contraddetti da altri. Recentemente E. Gabriel ha stabilito un confronto tra i casi di scarlattina curati con la sieroterapia e quelli sottoposti a semplici cure sintomatiche. Sono 420 casi, metà sieroterapizzati e metà no. La differenza dei risultati non fu tale da giustificare i primi entusiasmi: si ebbero complicanze nel 60 % degli iniettati e 71 % nei non iniettati. Cushing le Montréal su 1073 casi di scarlattina non sieroterapizzati ebbe: 41 % di forme complicate e 3,25 % di mortalità; su 800 casi trattati con il siero 25 % di complicazioni e 1,2 % di mortalità.

Gli autori americani basano la loro concezione sulla impossibilità di coltivare lo streptococco dal sangue dei malati di scarlattina e sulla dimostrazione che la tossina provoca nei soggetti recettivi tutti i sintomi della scarlattina. Ora ciò contrasta con ricerche di numerosi AA. che sono riusciti a provocare nell'uomo e nell'animale la scarlattina con sangue di scarlattinoso (Cantacuzène, Hlava, Landsteiner, ecc.) e contrasta anche con l'osservazione clinica della contagiosità delle squame.

Le ricerche dei coniugi Dick, dei collaboratori e dei seguaci della dottrina streptococcica hanno, con le loro osservazioni portato un contributo notevole alle nostre conoscenze in uno dei campi più interessanti della medicina, non ne risolvono però il problema eziologico.

Del tutto recentemente Herzberger ha isolato costantemente dalle fauci di scarlattinosi un micrococco gram-negativo che vive ad una parziale tensione dell'aria (20-40 mm. di mercurio a 18°) e che per i

caratteri si avvicina al Micrococcus gasogenes alcalescens anaerobius di Leukowicz. L'A. dà particolare importanza a questo germe nei riguardi della patogenesi della scarlattina e ne propone il nome di « Syzygiococcus Scarlatinae ». Filtrati di colture di questo germe, diluiti all'1 : 100 e inoculati nel derma dell'uomo sarebbero capaci di produrre un arrossamento della cute, fenomeno che sarebbe impedito dal siero di convalescente di scarlattina. Oltre a ciò il germe sarebbe agglutinato specificamente dal siero di scarlattinoso. Il potere agglutinante, presente fin dal secondo giorno dell'esantema, andrebbe man mano aumentando fino a raggiungere titoli abbastanza elevati (1 : 200).

Mandelbaum dal muco faringeo di scarlattinosi ha isolato un batterio a bastoncino che avrebbe la particolare proprietà di produrre mielina e, associato allo streptococco, esplicherebbe più intensamente la sua azione morbosa. L'A. avrebbe persino riprodotto con questo germe la scarlattina nel bambino.

Bürges nega però qualsiasi valore alle ricerche di Mandelbaum, che del resto non hanno avuto seguito. Il germe isolato non sarebbe altro che un pseudo difterico. A proposito di queste ricerche va segnalata una comunicazione fatta il 1° gennaio 1930 al 33° Congresso annuale della Soc. dei Batteriologi americani da R. Koch e R. R. Mellon dalla quale risulta la frequente presenza di germi difteroidi nel sangue di soggetti affetti da affezione streptococcica e particolarmente nel periodo che coinciderebbe con l'inizio della guarigione. Gli AA. considererebbero i microorganismi difteroidi come una dissociazione non patogena derivata dagli streptococchi stessi.

3° *La scarlattina quale sindrome anafilattica.* — È questa una concezione etiologica che si ricollega in parte alla etiologia streptococcica; può avere un certo valore come concezione patogenetica, non certo come teoria etiologica. Secondo Kreschmer, un individuo che abbia sofferto di un'angina streptococcica reagisce con sintomi tipici di anafilassi, quali l'esantema, la febbre, la linfoadenite, qualora venga colpito da una nuova infezione streptococcica. Meyer (1923) ribadisce questi stessi concetti: lo scoppio anafilattico sarebbe in rapporto alla capacità reattiva del singolo individuo, cioè alla sua costituzione. Vengono così spiegate le scarlattine senza esantema, l'immunità del lattante, ecc. Sarebbero ancora caratteri dell'anafilassi: l'eosinofilia e la polinucleosi, la positività della R. W.,

i disturbi della funzione epatica (ittero, aumento della bilirubina nel sangue e del bilirubinogeno nell'orina).

Giustamente affermano Di Cristina e Caronia « anche volendo ammettere una tale concezione etiologica, non è necessario escludere l'esistenza di un agente specifico »: per la scarlattina troppi elementi parlano per una malattia infettiva (ricorrenza epidemica, incubazione, contagiosità, esantema con caratteristiche costanti, ecc.).

4° *I virus filtrabili nell'etiologia della scarlattina.* — Si può dire che le prime ricerche che dimostrano la filtrabilità del virus scarlattinoso spettano a Casagrandi (1910): questo A. ha filtrato attraverso Berkefeld W una tonsilla, un pezzo di guancia con relativa mucosa ed un pezzo di milza di un bambino di 18 mesi, morto di scarlattina; inoculando i filtrati nell'occhio di coniglio, nelle vene, nel sottocutaneo e nel peritoneo dei cani ha osservato che « nei filtrati attraverso Berkefeld W può spesso ritrovarsi uno streptococco che, anche quando il filtrato venga inoculato soltanto nella cornea dei conigli, può ucciderli per streptococcemia ». Conferma a queste ricerche veniva poco dopo fornita da Ibba.

Bernhart (1911) con emulsioni in soluzione fisiologica di muco orale di scarlattinoso, iniettate sotto cute nelle scimmie, dopo 3 o 4 passaggi (poichè le scimmie muoiono di sepsi streptococcica) riesce ad ottenere dalle ghiandole un'emulsione sterile che iniettata in un'altra scimmia dà i fenomeni più caratteristici della scarlattina. Analogamente Cantacuzène provoca la scarlattina nella scimmia con materiale (sangue, liquido pericardico, emulsione di gangli tracheobronchiali) scarlattinoso e filtrato.

***

La rapida scorsa alla letteratura, la obiettiva osservazione di non trascurabili dati clinici, le ricerche personali e di altri studiosi della scuola del prof. Azzi permettono di fissare decisamente punti di valore non trascurabili nella risoluzione dell'annoso problema etiologico della scarlattina.

Revelli, in una serie di comunicazioni pubblicate nel *Bollettino della Soc. Italiana di Microbiologia*, n. 5-6-7-9, 1929, rendeva noto che è possibile isolare dal sangue, dal muco orale e da essudati di complicanze apparse nel corso di scarlattina stipiti di streptococco presentanti il particolare comportamento di svilupparsi a temperatura ambiente (10°-14°) e capaci di dare, inoculati nel coniglio, un

quadro caratterizzato da: cachessia profonda, con perdita del peso, desquamazione e a volte rapida morte con convulsioni e paralisi generale o parziale. Il muco orale di scarlattinoso, filtrato attraverso Berkefeld W, (controllato con bacterio prodigioso) e inoculato nel coniglio provoca il medesimo quadro morboso. Dal coniglio così inoculato si può ottenere in coltura dal sangue lo streptococco.

L'inoculazione di colture di streptococco isolate da scarlattinosi danno nei conigli un quadro morboso analogo a quello ottenuto con il filtrato di muco di scarlattinoso. Dalle squame cutanee del coniglio così inoculate è possibile ottenere uno streptococco che dimostra potere patogeno per il coniglio. Nel siero di sangue di scarlattinoso, lasciato a temperatura ambiente, si sviluppa dopo circa un mese lo streptococco; questa sierocultura, lasciata a temperatura ambiente si mantiene viva e virulenta anche dopo due mesi e mezzo. Analogamente si osserva sviluppo dal siero di sangue di conigli inoculati. La semina del filtrato di muco orale di scarlattinoso in brodo-sangue e in agar-sangue dà sviluppo a streptococchi. Il siero di coniglio, trattato con filtrato di muco orale di scarlattinoso, è dotato di un elevato potere agglutinante per gli streptococchi isolati da scarlattinosi.

L'inoculazione di filtrato di coltura di streptococchi ottenuta da conigli trattati con filtrato di muco, provoca in questi animali una streptococcemia: è possibile ottenere il fenomeno in serie e cioè: inoculazione di filtrato di muco orale in un primo coniglio, isolamento dal sangue dello streptococco; inoculazione in un secondo coniglio di filtrato di brodo-ascite, coltura dello streptococco isolato e così di seguito sino alla quarta generazione.

Il filtrato dei mezzi culturali di colture di streptococchi isolati dalla cavità orale, seminati in terreni solidi o liquidi, dà sviluppo a streptococchi patogeni per il coniglio, analogamente a quanto si ottiene con le semine di filtrato di muco orale.

Il siero di sangue dei conigli trattati con l'inoculazione di muco orale di scarlattinoso, può cagionare il fenomeno di estinzione di Schultz-Charlton nei malati di scarlattina.

Da questa numerosa serie di esperienze è possibile avanzare una ipotesi, e cioè che la scarlattina sia provocata da una fase di vita dello streptococco, fase invisibile e filtrabile.

Questa è l'ipotesi emessa per il primo da Revelli nel giugno 1929 e alla quale giunge anche Cantacuzène nella sua recente relazione al Congresso di Montpellier (ottobre 1929).

Allo stato attuale delle nostre cognizioni non esistono elementi tali da differenziare in modo certo lo streptococco scarlattinoso dagli altri streptococchi: nè i caratteri morfologici, nè le proprietà emolitiche, nè le prove fermentative; nè i prodotti del ricambio del microrganismo stesso. Non è stato possibile infatti dimostrare la specificità della tossina streptococcica nè con la reazione di Dick, nè con l'inoculazione agli animali, nè coi metodi sierologici. Nè è più oggi possibile considerare come carattere di specificità la agglutinabilità dello streptococco scarlattinoso con il siero di convalescente, giacchè è noto che questa proprietà può venir conferita a streptococchi di origine non scarlattinosa, coltivandoli in contatto di prodotti scarlattinosi. Tale agglutinabilità che si considerava come specifica, altro non sarebbe che funzione della presenza di un fattore sconosciuto esistente nelle orine, negli essudati infiammatori degli scarlattinosi, fattore che assorbito dagli streptococchi, conferisce loro la proprietà della agglutinabilità uguale a quella dello streptococco scarlattinoso. Il « fenomeno di Cantacuzéne », il potere cioè che possiede il filtrato di orina di scarlattinoso di rendere uno streptococco qualunque agglutinabile da un siero scarlattinoso è stato da più parti confermato.

Resterebbe soltanto da considerare la possibilità di una differenzazione dello streptococco scarlattinoso in base al suo potere di svilupparsi a basse temperature e la sua straordinaria resistenza « in vitro » come hanno constatato Ramsine e Revelli.

Mediante prodotti scarlattinosi raccolti di preferenza in forme ipertossiche e filtrati su candela è possibile riprodurre nelle scimmie e nei conigli una caratteristica sindrome scarlattinosa. Tali risultati non si possono spiegare che con l'ipotesi di un virus filtrabile, sia questo strettamente legato allo streptococco (Cantacuzène, Sacquépé è Liegeois), sia esso un germe a individualità ben definita, ossia una forma filtrabile dello streptococco, forma dotata di proprietà patogene che non avrebbe la forma visibile e coltivabile, sia come « fase di vita » invisibile dello streptococco. Questa fase di vita invisibile sembra essere legata ad un ciclo obbligato di esistenza « in vivo ».

Morbillo.

È certo impresa non lieve nè facile raccogliere, sia pur brevemente, la vastissima bibliografia fiorita intorno alla etiologia del morbillo. Ricorderò a semplice titolo storico in ordine cronologico

le varie ricerche (vedi: Castelli, *Tesi di docenza,* Istituto d'Igiene, Cagliari, 1915 e Polittzer, *La Presse Médicale,* 23-9-1925): non soffermandomi, essendo ciò superfluo, a vagliare e criticare reperti che, dopo il primo riconoscimento, non hanno avuto ulteriore conferma.

Fra le più antiche ricerche si sogliono citare quelle di Coze e Feltz di Strasburgo, i quali, nel 1871, isolarono dal sangue e dal muco nasale di un morbilloso una forma batterica assai sottile e mobile: il sangue contenente questa forma avrebbe, secondo gli Autori, prodotto nelle cavie uno stato febbrile per due o tre giorni. Nel 1880 Babés isolava dalle secrezioni catarrali e dal sangue di morbillosi, delle forme microbiche rotonde del diametro di 0,6 μ riunite in cifra di 8 od in piccole catene immobili, brillanti, difficilmente colorabili. Conon e Pielicke nel 1892 descrissero un altro germe isolato dal sangue dei morbillosi, talora presentante l'aspetto di un diplobacillo, talora di un diplococco, che specialmente si osserverebbe durante il periodo febbrile e si riscontrerebbe anche nella secrezione nasale. Lo stesso reperto sarebbe stato messo in evidenza dal Pomialowski in due serie di ricerche intraprese nel 1892 e nel 1895.

Barbier, nel 1897, avrebbe isolato dal secreto congiuntivale di morbillosi un germe simile al difterico, ma che inoculato in diversi animali si sarebbe dimostrato privo di virulenza. E analogamente parecchi anni dopo, Armand-Delille isolava dal sangue un B. pseudodifterico. Lesage (1900) riscontrò durante il periodo eruttivo nel muco del naso e della gola di morbillosi un micrococco estremamente piccolo, gram-negativo, formante nella gelatina piccole colonie finissime, simili a quelle di uno streptococco, tale germe inoculato nel coniglio per via sottocutanea o endovenosa, sarebbe capace di provocare una forma setticemico-emorragica; identici fenomeni l'A. avrebbe prodotto coll'inoculazione di sangue e coll'introduzione di muco morbilloso nelle fosse nasali dei conigli.

Pinna e Marini nella stessa epoca riferirono che dalle squame di morbillosi, oltre a batteri piogeni, poterono isolare uno speciale germe in forma di cocco, riunito in cifra 8, di rado a catena di 4-6 elementi, resistente al Gram, che indicarono per le sue qualità patogene il nome di Streptococcus piogenes-haemorragicus.

Iniezioni endovenose a cani e conigli di culture in brodo ne provocano la morte: quelle sottocute formazione di ascessi.

Giarrè e Picchi e Pacchioni avrebbero isolato, i primi dalla congiuntiva e dalla mucosa nasale e bronchiale di bambini morbillosi, l'ultimo da essudato di sierositi complicanti il morbillo, un bacillo

emofilo, simile a quello dell'influenza, reperto che secondo gli AA. non rappresenterebbe altro che l'agente causale di un'infezione secondaria. Nel 1904 Zlatogoroff avrebbe ritrovato nel sangue e nelle secrezioni nasali e congiuntivali di morbillosi un germe poco mobile, spesso accoppiato, gram-positivo e che riscontrerebbesi anche nei preparati microscopici del sangue, di muco nasale e di secreto congiuntivale. Tale germe non è però dotato di potere patogeno per gli animali. Un reperto simile avrebbe ottenuto Borini con risultati sperimentali di un certo interesse: gli animali inoculati venivano a morte nello spazio di 3-6 giorni, presentando all'autopsia focolai di pneumonite lobulare.

E ancora altre forme batteriche sono state individuate da Hallier, da Klotz, da Klebs, da Van Niessler, da Czaykowski, da Thomson. Ciaccio nel 1909 in otto casi studiati anatomicamente e istologicamente ebbe reperto costante nella milza, capsule surrenali, timo, polmoni (mai nella pelle) di un bacillo lungo quanto il diametro di un globulo rosso, grande circa 1 μ colorabile facilmente coi colori di anilina, resistente al gram, con spazi chiari nell'interno, alternati regolarmente con punti cromatici. In tutti gli organi interni e nella cute ebbe a notare costantemente corpiccioli del diametro di 1-2 μ intensamente colorabili con i colori di anilina, senza poter affermare che si trattasse di granuli di cromatina o di nucleoli. Sellard Bigelow germi pleomorfi inoculati ad animali provocherebbero lesioni cutanee eritematose. Salimbeni e Kermorgant dal sangue e dall'orina coltivarono spirochete.

È di questa epoca un lavoro di Pacchioni e Francioni: questi AA. affermano che nella maggioranza dei casi di morbillo a decorso normale il sangue seminato dei vari mezzi culturali non dà sviluppo ad alcun germe, e pur riuscendo a trovare sovente un batterio emofilo simile a quello di Pfeiffer nel secreto congiuntivale e nasale, non credono di poter affidare a questo germe alcun significato nell'etiologia della malattia. Avanzano l'ipotesi che il morbillo si possa considerare come una malattia infettiva locale con fenomeni tossici generali; nella quale i fatti eruttivi sono dovuti alla formazione critica di anticorpi come nella malattia da siero.

Nè sono mancati Autori che osservarono delle speciali inclusioni cellulari: intendo riferirmi al Field, che nel 1904 eseguendo delle ricerche nel liquido vescicatorio di morbillosi su 13 casi esaminati, in 8 osservò quelle particolari inclusioni che il Mallory descrisse per la scarlattina. Egli dapprima le interpretò come protozoi, ma più tardi,

tornando sulla questione (1904) le ritenne come prodotti di degenerazione cellulare dovuti ad una attività citolitica del virus. E a questo stesso concetto si avvicinò l'Ewing (1909) che studiando le alterazioni degli epitelii nel morbillo, venne alla conclusione che il carattere essenziale delle lesioni consiste in una cheratizzazione più marcata con focolai di necrosi e una vacualizzazione degli elementi epidermici e degli apparati ghiandolari del derma.

Tunnicliff (1917) da 42 su 50 casi di morbillo riuscì ad isolare piccoli diplococchi gram-positivi, viridans, anaerobi in prima generazione, aerobi successivamente. Tali germi sono filtrabili attraverso Berkefeld e dimostrano potere patogeno per il coniglio, il topo e la scimmia: non per la cavia. Per quello che riferisce l'Autore, la malattia sperimentale non assomiglia al morbillo, nè valore dimostrativo hanno le ricerche sull'agglutinazione; indice epsonico e deviazione del complemento con il siero di ammalati infettati. Il siero di morbilloso agglutina il germe a un titolo molto basso (1 : 8). Qualche anno dopo Tunnicliff e Moody con il diplococco isolato dal muco di morbillosi iniziano nuovi tentativi sperimentali nelle scimmie. In tre su 4 scimmie provocano febbre, esantema e all'esame del sangue riscontrano leucopenia: anche l'inoculazione di acqua di lavaggio della cavità orale di morbilloso dà sviluppo nella scimmia ad un particolare quadro morboso in cui, unitamente a manifestazioni cutanee, si ha febbre. Sintomi analoghi ottengono con l'inoculazione di cultura di settima generazione. Anche culture filtrate attraverso candela provocarono, inoculate in conigli, esantema: e i conigli così trattati non reagirono a successive inoculazioni con acqua di lavaggio della cavità orale di morbillosi. I risultati di questa serie di ricerche appaiono peraltro poco convincenti: il quadro morboso sperimentale è poco tipico: dagli animali inoculati non è stato isolato il germe; il risultato culturale non è stato costante (a volte si è avuto sviluppo di spirilli), il titolo di agglutinazione è eccessivamente basso e l'indice opsonico non è certo elevato.

Un particolare orientamento sulle ricerche etiologiche del morbillo è portato da Ludwig Hektoen che con esperienze rigorosamente condotte dimostrava che il sangue di morbillosi, pur essendo batteriologicamente sterile, inoculato nell'uomo era capace di riprodurre l'infezione morbillosa. Con tali esperienze Hektoen veniva a dimostrare che l'agente etiologico del morbillo era da ricercarsi *in un virus non coltivabile nei comuni terreni di coltura,* distruggendo di colpo tutto quanto era stato pubblicato sull'etiologia del morbillo.

La filtrabilità del virus dimostrata con la riproduzione sperimentale del morbillo è chiaramente messa in rilievo da Anderson e Goldberger (1911). Questi AA. riuscirono ad inoculare il virus morbilloso con esito positivo alle scimmie: con il sangue di scimmie così infettate riproducono la malattia in altre tre scimmie (10 giorni d'incubazione, febbre per 4 giorni, eruzione per 5 giorni): e così pure con siero di sangue sottoposto a filtrazione. La possibilità della trasmissione della malattia alla scimmia è stata per un certo periodo questione controversa, da alcuni confermata (Paulet e Chavigny, Hektoen e Eggers, Lucas e Prizzer, Tunnicliff, Hlava) da altri negata (Jurgelunas, Sellards, Wentworth, Grunbaum) e ciò sino a quando Nicolle e Conseil dimostrarono in modo definitivo la possibilità di provocare un quadro sperimentale analogo a quello clinico, a due altre scimmie e ad un bambino, con iniezioni di sangue preso a scimmie infettate sperimentalmente.

Blake e Trask infettarono scimmie sia con sangue, sia con acqua proveniente dalla lavatura della gola di morbillosi. Quest'acqua conservava potere infettante anche dopo filtrazione, provocando leucopenia, congiuntivite, febbre, esantema. Con iniezione intracheale di emulsioni di pelle di scimmie infette riuscirono in sei passaggi successivi a trasmettere la malattia. La malattia sperimentale conferisce immunità di fronte ad altre infezioni.

Nevin e Bittmann provocarono il morbillo nelle scimmie (leucopenia, febbre, esantema) con sangue di morbilloso e con sangue di scimmie infette. Queste stessi AA., in ricerche successive, hanno osservato il segno di Koplik nel 33 % e manifestazioni cutanee nel 100 % dei conigli inoculati di materiale morbilloso.

A Home risalgono i primi tentativi di riproduzione della malattia nell'uomo. Questo Autore ebbe risultati positivi inoculando 12 individui con sangue di morbillosi.

Rasori riuscì ad infettare un bambino con sangue ottenuto dalla pupilla morbillosa e analogamente Speranza infettò sè stesso e sei bambini. Frigori sè stesso. Negli 2 bambini, Bufalini ebbe parziali risultati positivi ottenendo la riproduzione della malattia in 4 individui su 6 inoculati.

Esperienze nell'uomo molto più estese di Katona danno una percentuale di risultati positivi pari al 93 % dei casi con l'inoculazione di sangue, di papule o di squame. La malattia, prodotta sperimentalmente, conferisce nell'uomo parimenti immunità.

Le esperienze di tutti questi autori danno al virus morbilloso

un peculiare carattere tale da separarlo nettamente dai virus corrispondenti alle forme fin qui note dei comuni batteri. Per questo senso definitivo sono le ricerche di Castelli (1915) che dimostravano che i filtrati di materiale prelevato dalla mucosa bruno-faringea e dalle squame cutanee di morbillosi oltre determinare nei conigli elevazioni termiche « inoculati della cornea dei conigli, previa lesione dell'epitelio con l'ago di tatuaggio determinano la comparsa di granuli disposti o in tutto il protoplasma o alla periferia dello stesso o del nucleo ».

Il virus del morbillo è filtrabile, si trova nel sangue, nelle squame e nei prodoti di lavaggio del cavo naso-faringeo dei malati: può trasmettersi all'uomo, alla scimmia e al coniglio riproducendo il quadro morboso che rassomiglia moltissimo al morbillo umano. Di più le scimmie guarite dal morbillo sperimentale acquistano l'immunità dimostrandosi refrattarie a successive inoculazioni di virus.

Una riprova della filtrabilità del virus è data dall'osservazione clinica di casi di morbillo congenito che sono spiegabili solamente con il passaggio del virus morbilloso dalla madre al feto attraverso il filtro placentare; quando il passaggio avviene nel momento dell'invasione dell'organismo materno (al 7°-8° giorno dal contagio) il feto reagirebbe come fosse una parte del corpo della madre e si avrebbe quindi coincidenza perfetta nelle manifestazioni cliniche della malattia della madre e del feto: negli altri casi il ritardo della comparsa del morbillo nel feto o nel neonato rispetto a quello della madre sarebbe spiegato con il passaggio del virus attraverso la placenta in un periodo tardivo, nel momento dell'esantema o dell'eruzione. L'ipotesi del contagio fetale nel momento del contagio materno potrebbe essere dimostrato in modo sicuro dalla comparsa contemporanea nella madre e nel neonato di manifestazioni cliniche identiche dall'8° al 14° giorno post partum e questa fortunata occasione di osservazione si è presentata a Debré e Joannon. Nel caso descritto da questi AA. l'inoculazione sarebbe avvenuta attraverso la placenta poco prima della nascita e dimostrerebbe la presenza del virus nel sangue del feto fin dall'inizio del periodo d'incubazione materna (P. Castellani - *La Clinica Pediatrica* - Archivio n. 1, 1930).

Una particolareggiata ed obbiettiva disamina si rende ora necessaria di fronte ai risultati annunciati dal Caronia nel 1923. L'argomento della eziologia del morbillo, rimasto sopito per alcuni anni, è ritornato improvvisamente di piena attualità: le ricerche dell'A. italiano e della sua scuola sono state da più parti riprese, all'inizio

da alcuno confermate, dai più in seguito smentite. È noto come Caronia, usando il metodo di ricerche già iniziato dal Di Cristina nel 1921 per la scarlattina, abbia isolato in terreno Tarozzi-Noguchi dal sangue, dal morbillo osseo, dal liquido cefalo-rachidiano, dal filtrato di essudato naso-faringeo un microorganismo di 0,3-0,4 μ rotondo, spesso accoppiato, gram-negativo. Nel terreno catalizzatore il germe si trapianta in serie infinita e verso di questo si sviluppano nel siero dei morbillosi agglutinine, opsonine, ambocettori che permangono a guarigione avvenuta.

L'inoculazione ai giovani conigli per via endovenosa di forti dosi di sangue di morbillosi in atto determina un quadro morboso analogo al morbillo umano. Dal sangue degli animali così infettati si isola in cultura lo stesso germe che si isola nei morbillosi e nel loro siero di sangue si formano anticorpi specifici per il germe isolato dall'uomo.

L'inoculazione per via endovenosa in dosi forti e ripetute, di colture di recente ottenute e ricche di sviluppo nei giovani conigli dà spesso una forma grave, molto simile al morbillo umano e seguita talvolta da morte. In questi animali così infettati il risultato delle ricerche morfologiche, sierologiche, culturali, è uguale a quello che si ottiene per gli ammalati di morbillo. L'inoculazione nei bambini sani di colture inattive o attenuate, provoca immunità verso il morbillo e nessun accenno di malattia.

L'inoculazione invece a bambini sani, di dosi alte e ripetute di colture ricche di sviluppo e di recente ottenute provoca una manifestazione di una forma tipica per quanto attenuata di morbillo.

Queste in breve le conclusioni delle ricerche che sembravano soddisfare pienamente a tutte le esigenze della indagine batteriologica, ma alle quali oggi noi non possiamo accordare un valore così assoluto, considerata la discordanza di molti dei risultati ottenuti da posteriori ricerche.

Le prime obiezioni per così dire aprioristiche spettano a Lumière (1924). Secondo quest'A. occorreva verificare se nei medesimi terreni seminati con sangue normale non si rinvenissero forme microbiche identiche, se i tessuti di animali sani non contenessero germi, se l'intorbidamento del mezzo culturale non potesse essere riferito alla eterogeneità dei colloidi componenti i mezzi medesimi, se dei fenomeni patologici provocati negli animali (e in conseguenza nel bambino) con iniezioni di colture non potesse incolparsi la eterogeneità delle albumine contenute nelle colture e naturalmente filtrabili attraverso candela.

Tutte queste obbiezioni hanno avuto conferma nei lavori sperimentali successivi ed io stesso ho potuto convincermene sperimentando su ammalati di scarlattina e di morbillo, ricoverati all'Ospedale Amedeo di Savoia per le malattie infettive di Torino, ricerche eseguite nel 1924 e per altro non rese di pubblica ragione. Il primo punto controverso che più ha offerto il fianco alle critiche è che in terreno Tarozzi-Noguchi sterili o seminati con materiali di soggetto sano si sono dimostrate forme granulari non distinguibili da quelle fornite, da tubi seminati con materiale morbilloso. Tale constatazione induce a pensare che se pure il virus morbilloso si conservava o viveva nei terreni Tarozzi-Noguchi dando segno della sua presenza per mezzo delle prove sperimentali nell'uomo e negli animali, esso fosse assolutamente indipendente dalle forme granulari, dovute all'autolisi del pezzo d'organo o ad alterazioni provocate nel terreno dalla permanenza in termostato e presente in una fase invisibile.

È del marzo 1925 la prima comunicazione di Guardabassi nella quale si afferma che altri caratteri tintoriali e culturali abbisognano al microorganismo del Caronia per distinguerlo da altri numerosi microorganismi di recente descritti quali agenti etiologici di svariate malattie e da granuli gram-negativi privi di significato che si rinvengono nei mezzi culturali a catalizzatore e negli strisci praticati per controllo con organi di animali sani.

Salvioli, poco dopo, nel riferire su 36 casi di morbillo in cui aveva praticato l'emocultura, pur avendo avuto un'alta percentuale di negativa (22 volte) crede che le modificazioni osservate nel substrato culturale e che si ripetono nei successivi passaggi stiano ad indicare l'esistenza e lo sviluppo di un « quid » vitale proveniente dal sangue dei morbillosi come avrebbe dimostrato Caronia. La dimostrazione di forme caratteristiche del germe si è avuto solo saltuariamente.

Negative sono rimaste invece le ricerche culturali di Vernoni, di Revelli, di Burgers e Bachmann, di Szirmay e Jacobowicz. Quanto alle prove sierologiche che permetterebbero di giudicare indirettamente della presenza del virus, Casagrandi le considera a priori fallaci: l'aspetto presentato dalle colture in terreni catalizzatori, seminati con materiali contenenti virus invisibili, sta verosimilmente in rapporto con fenomeni di autolisi che si verificano nei liquidi contenenti lipoidi di vario tipo e non a moltiplicazione del virus stesso. Nessun effetto dalla vaccinazione col metodo Caronia ottennero Meyer, Hecht e Redlich.

Brockmann, Feggin, Hirszfeld, Mayzner e Przesmycki osserva-

rono che il siero di due conigli immunizzati col vaccino morbilloso preparato con il mezzo Tarozzi-Noguchi dà un'agglutinazione positiva sino a 1 : 640 verso gli streptococchi emolitici della scarlattina, come nei casi in cui avevano preparato conigli con vaccino scarlattinoso.

Particolare riferimento meritano ancora esperienze recenti (1927) di Guardabassi e che si ricollegano in parte alla dibattuta questione delle inclusioni leucocitarie: questo A. facendo uso di terreni brodo-ascite (PH 7,2) sotto olio di vaselina e seminati di sangue di morbilloso e di materiale filtrato (orine, muco nasale, essudati faringei) ha osservato sviluppo di piccolissimi cocchi isolati, accoppiati o a breve catena, non contornati da alone, gram-negativi. Le culture giovani sarebbero filtrabili a Berkefeld. La prova di agglutinazione risulterebbe nettissima fino a 1 : 2000 col siero di individuo che aveva superato il morbillo 7 anni prima, fino a 1 :50 con siero di morbilloso in atto; negativa con siero di individuo che mai era stato morbilloso. La inoculazione del germe isolato provocherebbe costantemente nei conigli una congestione di alto grado di tutto il sistema vasale, più spiccata nei polmoni e nei reni, bronchiectasie od obliterazione dei lumi bronchiali, peribronchite, perivascolarite con formazione di focolai bronco-pneumonici peribronchiali e perivascolari. Il sistema vascolare apparirebbe primitivamente e generalmente colpito, e ciò trova una rispondenza nella nozione ormai sicura, dopo le recenti esperienze di Nicolle e Conseil della presenza precoce del virus morbilloso nel sangue circolante e nella relazione trovata in precedenza dal von Pirquet fra le vascolarizzazioni e le lesioni cutanee. L'A. che ha affermato più volte la presenza anche nel morbillo di inclusioni leucocitarie tipo Amato, ha tentato di provocare nei leucociti umani e di cavia la produzione delle inclusioni con risultati alquanto probativi. Guardabassi ammetterebbe quindi che il virus morbilloso rappresentato dalle particolari forme granulari descritte e identificabili in parte con quelle del Caronia si paleserebbe con reperti morfologici analoghi a quelli di altri virus filtrabili (inclusioni tipo Amato, granuli delle cellule corneali di Castelli, corpi acidofili della saliva di Sangiorgi).

Il fervore della ricerca si mantiene vivo: il problema dell'etiologia del morbillo non è certo chiuso; ancora recentemente Zlatogoroff Burowa e Nascledschewa riferivano di essere riusciti a coltivare un germe in terreno Tarozzi-Noguchi patogeno per i conigli e le scimmie, filtrabile, anaerobio, trapiantabile in serie. L'analogia con il germe di

Caronia e di Guardabassi è grande, tanto da far pensare a varianti culturali di un medesimo microorganismo; verrebbe così riaffermata la possibilità di coltivare in forma visibile il virus morbilloso: e a questo proposito esprimo il convincimento, più volte ripetuto, della poca opportunità che deriva a tale genere di ricerche dall'uso di terreni capaci di dare per sè stessi produzione abbondante di granuli.

VARICELLA.

Per quanto le difficoltà della indagine bibliografica permettano di affermare, poco numerose sono nella letteratura le ricerche etiologiche della varicella. La fase delle discussioni fra l'identità etiologica della varicella con il vaiuolo è ormai sorpassata e definita.

La varicella è una malattia etiologicamente diversa dal vaiolo, pur potendo il quadro clinico mostrare con questo delle grandi somiglianze e coincidenze; e ancora va distinto dall'alastrim, da quella forma morbosa cioè, che è stata definita da Netter, come un « ibrido di varicella e di vaiolo » e che pare abbia fatto la comparsa anche in Italia. I primi casi sospettati con fondatezza quali alastrinici, si sono verificati a Milano nel 1925, contemporaneamente ad una epidemia più vasta di varicella; altri casi vennero segnalati in Romagna nel 1926. Qui mi piace accennare, ritornando più estesamente in seguito, a proposito del dibattuto rapporto tra zoster e varicella, alla particolare distribuzione degli elementi eruttivi alastrinici osservato in un numero abbastanza cospicuo di casi, dalla quale risulterebbe la tendenza degli elementi a disporsi lungo il decorso di tronchi nervosi. Tale rilievo, più largamente controllato, potrebbe mettere in luce una predilezione del virus alastrinico e avvicinarlo almeno semeiologicamente a quelle forme di manifestazioni cutanee neurotrope, quali ad esempio la zona, e in largo senso al vasto gruppo delle affezioni erpetiche.

Tra i primi tentativi d'identificazione del virus, peraltro, mai confermati in seguito, debbono essere ricordati le ricerche di Guttmann. Questo A. isolava nel 1900, dal contenuto di vescicola varicellosa, il *micrococcus viridis flavescens* e il *micrococcus piogenes aureus* e *cereus albus*.

Barezzi ha rinvenuto un micrococco ovoide. Pfeiffer ha dimostrato l'esistenza di un parassita simile alle amébe. Tenholt ha descritto pure una speciale forma batterica. Fede e Durante (1905) un

bacillo corto, ad estremi arrotondati, gram-negativo, mobile, non patogeno per le cavie e per i conigli. Nessuno di questi germi si può certo ritenere come l'agente della varicella.

Waele e Sugg (1905) isolarono in varie epidemie dal sangue un streptococco che mostrava caratteri immunitari particolari: veniva solo agglutinato dal sangue di varicellosi. Questi streptococchi non sono affatto virulenti, non esplicano potere patogeno negli animali. E analogamente isolarono dal sangue di vaiolosi streptococchi che non venivano agglutinati dal sangue di neonato, nè dal sangue di uomini o vitelli non vaccinati, erano invece agglutinati dal siero di sangue di uomini vaccinati, di vitelle vaccinate o di uomini vaiolosi.

Bertarelli (1909) ha tentato, con esito negativo, l'inoculazione del contenuto di vescicola sulla cute dell'uomo e delle scimmie; con l'inoculazione invece nella cornea del coniglio otteneva a volte cheratiti lievi e transitorie. L'A. non dà significato parassitario al reperto. L'esame del materiale prelevato dalle vescicole, colorato con il Giemsa, dimostra nelle cellule del derma dei fini granuli colorati in rosso, circondati da un piccolo alone acromatico. Il reperto, sebbene non costante, si ripete con una certa frequenza. Queste granulazioni manifestamente si differenziano dai corpuscoli del Guarnieri. L'A. non crede che questi granuli siano parassiti.

Magnon e De la Riboisier (1911) nelle vescicole osservarono la presenza costante di un batterio fine, di dimensioni variabili da 1 a 2 μ di lunghezza, 0,2-0,3 μ di larghezza, sovente con disposizione a palizzata o formanti ammassi caratteristici. Gli AA. si sono limitati all'esame batterioscopico della sierosità della vescicola, raccolta su un vetrino. Nelle sezioni di inclusione in paraffina di croste varicellose rilevano l'esistenza di ammassi dei medesimi germi.

Ricordo a questo punto che Auricchio e gli allievi della scuola di Caronia, Sindoni e Vitetti nel 1924 applicando allo studio della varicella i terreni di coltura del tipo Tarozzi-Noguchi e di Di Cristina, di quei metodi cioè, che avevano servito con successo per le ricerche etiologiche sulla scarlattina, sul morbillo, sulla rosolia, sul reumatismo articolare acuto, sulla rabbia, sulla encefalite epidemica, sulla poliomielite, riuscirono ad isolare dal sangue e dalla vescicola di varicellosi: « corpi rotondeggianti piccolissimi (fino a 0,4-0,5 μ) grampositivi, isolati, a coppie o in gruppi di parecchi elementi ». Questi piccolissimi corpi sarebbero trapiantabili in serie infinita nei terreni Tarozzi-Noguchi. Filtrando le culture attraverso Berkefeld W. e Chamberland L 7-9-11 e innestando il filtrato si avrebbe nei soliti

terreni sviluppo dei medesimi elementi. Questi elementi si troverebbero anche nel contenuto di vescicola. Nei conigli l'iniezione endovenosa della cultura non dava che arresto di peso verso l'8°-10° giorno, e poi gli animali si riprendevano. La emocultura dei conigli iniettati darebbe nei terreni catalizzatori lo sviluppo del germe.

Le ricerche di questi AA., ripetute da Pincherle e Vegni con la massima attenzione e con le dovute cautele non sono state confermate e così pure Szirmai e Jacobovics ottennero esito negativo dal tentativo di trasmissione della varicella all'uomo con iniezioni di colture di questi terreni.

Maggior contributo alla conoscenza etio-patogenetica della varicella deriva dai tentativi di riproduzione sperimentale. Tra i primi devesi ricordare lo Steiner, che nel 1875 riferiva di aver ottenuto in 8 su 10 bambini, mediante l'inoculazione del contenuto di vescicola varicellosa, un esantema generalizzato all'8° giorno dall'inoculazione. Queste esperienze hanno aperto la via a ricerche di immunizzazione antivaricellosa: e l'argomento acquista ora particolare importanza per le osservazioni più numerose e frequenti segnalate in questi ultimi anni di complicanze gravi legate verosimilmente al medesimo virus della varicella (mono-paraplegie, sindromi coreiche, atassiche, forme encefalitiche, ecc.). Il problema è tanto più vitale per i Brefotrofi e per gli Ospedali dove sono raccolti bambini in cattive condizioni di nutrizione e di resistenza organica, e dove l'estrema contagiosità dell'infezione impongono tempestive applicazioni di mezzi profilattici.

I tentativi di vaccinazione finora compiuti a scopo di determinare un'immunità attiva contro l'infezione varicellosa si partono dal presupposto che il virus, finora ignoto, esista con un certo grado di vitalità e di virulenza nel contenuto delle vescicole varicellose. I tentativi di vaccinazione, compiuti dai diversi sperimentatori, hanno avuto esito estremamente vario. Kling di Stoccolma ottenne felici risultati dall'inoculazione della linfa varicellosa, riuscendo a provocare una malattia leggera, limitata al punto d'inoculazione e capace di determinare nell'organismo un'immunità verso il virus varicelloso. La pratica della vaccinazione alla Kling, ripresa da altri ricercatori, portò a risultati contradditori: alcuni confermano, almeno parzialmente, il valore del metodo, (Rubinoff, Rutelli, Lapidus, Gyr, Hotzen, Benini) altri negano qualunque efficacia protettiva di fronte al contagio varicelloso (Handric, Michael, Mayer, Hess). Va segnalato ancora il fatto che nei tentativi di immunizzazione, alcuni Autori, tra cui ricordo il Michael di Chicago, hanno osservato dopo 12-14 giorni

dalla vaccinazione un'eruzione disseminata e diffusa di vescicole varicellose su tutto il corpo: *onde logicamente devesi dedurre che la varicella è una malattia inoculabile.*

Le prove tentate per dimostrare la patogenicità delle linfe varicellose all'animale da esperimento si può dire condussero costantemente ad un risultato negativo. Le scimmie si mostravano del tutto refrattarie (Park, Martin e Tyzzer): molto più numerose le prove sulla cornea del coniglio: ma anche queste non diedero risultati positivi, ovvero non offrirono punti d'appoggio tali da permettere di assegnare alle alterazioni macro- e microscopiche osservate un sicuro carattere di specificità. Ciò venne ancora confermato recentemente da M. Pincherle e M. Vegni (1927) che inocularono in conigli linfa varicellosa prelevata ai primi stadi della malattia e subito inoculata nella cornea previa scarificazione lineare, sia per via endovenosa, sia per via cerebrale: tutte queste serie di esperienze non portarono ad alcun risultato positivo.

Caronia, nel 1922 tentò la riproduzione sperimentale della varicella, ricercando il virus nel sangue dei varicellosi in periodo iniziale di malattia. Negativa riuscì l'inoculazione nei conigli trattati per via endovenosa e intraperitoneale. Qualche successo diedero invece le prove nei bambini. In due bambini, uno di 5 anni che mai aveva sofferto di varicella, e l'altro di 7 anni, che aveva già avuto parecchi anni prima la malattia, inoculò 2 cc. di sangue prelevati ad un bambino varicelloso. Nel primo si è avuto nel 14° giorno dell'inoculazione una tipica ma lieve eruzione varicellosa, prima alla fronte poi al dorso e appena accennata agli arti, accompagnata nel primo giorno da punte febbrili (37°,5-37°,7). Tale eruzione rapidamente è regredita ed è scomparsa in capo a 5 giorni. Nell'altro bambino non si è verificato alcun fenomeno morboso. Queste esperienze dimostrerebbero la presenza dell'agente specifico nel sangue e la sua capacità infettiva.

Nel 1923 Rivers e Tillet non riuscirono a dimostrare la contagiosità del sangue varicelloso nè con iniezioni endovenose nè con inoculazioni endocerebrali di esso nel coniglio. La dimostrazione riuscì solo dopo che vennero adottati degli accorgimenti tali da arricchire il virus, e da adattarlo all'organismo del coniglio; scopo raggiunto inoculando sangue varicelloso nei testicoli di conigli e inoculando successivamente in serie sospensioni di testicoli infetti nei testicoli sani (passaggi a intervalli di 4 giorni). Dopo 4-8 passaggi è possibile dimostrare la presenza del virus nei testicoli; sospensioni di testicoli portati sulla cute scarificata o sulla cornea del coniglio

vi determinano una reazione che si osserva anche nei testicoli dei conigli inoculati. In sezioni di queste cornee gli AA. avrebbero trovato lungo le linee di scarificazione, un tipo di degenerazione cellulare che considerano simili alle lesioni cellulari riscontrate nella pelle umana, inoculata con virus varicelloso. È pure interessante ricordare che furono trovate nei focolai morbosi, provocati con lo stesso virus, ad esempio nel testicolo, inclusioni cellulari simili a quelle osservate nelle forme erpetiche. Dopo altri passaggi tale reazione della cute scarificate si fa in forma di vescicole caratteristiche: i conigli inoculati presentano fenomeni generali (febbre, perdita di peso, diarrea). Se si irrita la cute di questi conigli che presentano una reazione generale (ad esempio con scarificazioni) spesso compaiono delle vescicole tipiche dopo 4-10 giorni, nei punti irritati. Ciò rende molto probabile la presenza del virus nel sangue di questi animali. E dalla constatazione che nei varicellosi le vescicole compaiono spesso nei punti in cui la pelle viene irritata, si ha la nuova conferma *della probabile presenza del virus varicelloso nel sangue dei malati.*

Le ricerche di Rivers e Tillet non sono state confermate, e del resto gli AA. si mostrarono molto prudenti nelle conclusioni, non affermando in modo reciso che i ceppi di virus, da loro isolati, rappresentassero proprio il vero agente etiologico della varicella. Con analoghe modalità di tecnica, adoperando non il sangue di varicellosi, ma sangue di reumatici, ed anche di soggetti normali, Andrevers e Miller ottennero identici risultati clinici ed immuno-biologici. Pincherle e Vegni riferiscono di non essere riusciti ad isolare dal sangue di un malato in periodo iniziale di esantema varicelloso un virus patogeno per l'animale da esperimento (coniglio). Si tratta invero di un'unica serie di esperienze ed eseguite con materiale prelevato da un solo ammalato, e quindi non bastevoli ad infirmare le più numerose esperienze di Rivers e Tillet.

Da rilievi d'ordine clinico ed epidemiologico sono state avanzate ipotesi di correlazioni genetiche tra lo zoster e la varicella: ipotesi per il primo esposta da Bokay nel 1892 e corredata successivamente da altri esempi dimostrativi di numerosi autori (Berti, Pincherle, Frei, Gismondi, Muggia Alberto, Fornara, Francioni, Netter, Kundratiz, Cividali, Dumontet, Vaglio, ecc.). Attualmente il problema del medesimo agente etiologico e della possibilità di contagio tra zona e varicella è argomento appassionante di discussioni dibattutissime, specie in Francia, tra la cosidetta scuola unicista con a capo il

Netter e la scuola dei dualisti con a capo il Comby che sostiene non esservi tra l'herpes zoster e varicella alcun rapporto.

Il persistere di questa divisione nel campo scientifico, in unicisti e dualisti dopo numerose discussioni e importanti prove sperimentali è inerente al fatto che tuttora l'agente patogeno di queste due malattie è sconosciuto.

Mi pare superfluo il riassumere qui la mole immensa dei lavori su questo argomento: gli AA. numerosissimi che fornirono alle due ipotesi dati interessanti dedotti da elementi epidemiologici, sperimentali e clinici si mantengono nelle loro posizioni nè disarmano avendo certo a disposizione armi sufficienti per difendere la posizione assunta: pure a me pare che l'esame critico oculato dell'interessante problema non possa avere soluzione che dalla batteriologia: la geniale ipotesi di Bokay non può essere considerata come assurda bensì come la più probativa. Seri argomenti ci parlano in modo convincente dell'esistenza di particolari zoster riferibili al virus varicelloso: ma la conoscenza del virus o dei virus di queste due malattie a noi tuttora manca.

Rosolia.

Per molto tempo questa malattia è stata definita come una forma « ibrida » di morbillo e di scarlattina; attualmente però per opinione concorde ogni dubbio sulla esistenza a sè della rosolia è scomparso e la distinzione dalle altre malattie esantematiche avviene in modo netto e preciso. La più spiccata tendenza alla infezione si verifica in bambini tra i due e i dieci anni: i lattanti si ammalano difficilmente. La contagiosità della rosolia è molto minore del morbillo e quindi di rado si verificano delle epidemie molto estese; il contagio avviene per lo più in modo diretto, sembra però che il « virus » aderisca anche agli oggetti: il suo trasporto può essere effettuato anche da terze persone. Come sorgente di infezione sono da considerarsi per lo più le scuole, gli istituti, gli asili infantili, i giardini d'infanzia e in genere i luoghi ove si radunano molti bambini. L'attenta osservazione dei dati epidemiologici ci porta a considerare che l'estendersi dell'infezione viene facilitata dall'inverno e dai tempi piovosi protratti, in seguito ai quali i bambini sono costretti a trattenersi in luoghi chiusi, aumentando così le condizioni che facilitano il contagio.

L'aver subìto la rosolia non preserva dal contrarre il morbillo o la scarlattina, e dopo il morbillo e la scarlattina non è esclusa la possibilità di contrarre la rosolia: questa legge porta come effetto immediato che la rosolia dev'essere considerata una malattia a sè, specifica e del tutto indipendente dagli altri esantemi acuti. All'opposto di ciò che si verifica per il morbillo e la scarlattina, il pericolo di contagio è per la rosolia di durata alquanto più breve, in genere tre-quattro giorni, nel periodo cioè dell'esantema. Su questa malattia, che ha quasi sempre decorso mite, senza complicanze e con esito buono a breve scadenza, esistono scarse ricerche di natura etiologica: a ciò contribuisce certo il fatto che difficilmente si ha occasione di osservarne dei casi negli ospedali.

In ordine cronologico le prime ricerche sono di Edwards il quale isolò dal sangue di malati di rosolia dei micrococchi: successivamente Fomand e Klamann ebbero reperto analogo. L'importanza etiologica di questo reperto venne in seguito smentita dallo stesso Edwards, che era ritornato con successive ricerche sull'argomento. Tunnicliff nel 1918, comunicò di aver isolato dal sangue di bambini affetti da rosolia un germe polimorfo anaerobiotico nei primi innesti, aerobiotico nei successivi, che per i suoi caratteri morfologici culturali e per le stesse differenze esistenti tra i diversi ceppi non presenta caratteri di specificità. Nel 1925 Sindoni e Ritossa sulle tracce di ricerche analoghe del Prof. Caronia e facendo uso di terreni a funzione catalizzatrice riferiscono dettagliatamente sull'etiologia della rosolia. In ricerche morfologiche eseguite sugli elementi eruttivi raschiando le macule con la lancetta e facendo preparati per striscio, gli AA. osservarono in mezzo agli elementi del sangue, scarse forme bigemine. Per le ricerche culturali vennero fatte semine del sangue e dell'essudato naso-faringeo in terreni Tarozzi-Noguchi mantenuti in anaerobiosi con stratificazione di olio di vaselina, ottenendo, dopo circa 12 giorni, sviluppo di forme accoppiate, leggermente ovoidi, Gram-positive. La filtrazione del materiale culturale attraverso candela Chamberland L7 e con l'innesto del filtrato gli Autori hanno riottenuto la cultura con gli stessi caratteri. È stata tentata l'infezione sperimentale negli animali e nell'uomo. Conigli iniettati di coltura per via endovenosa mostrano malessere passeggero. I bambini iniettati (4 osservazioni) hanno reagito con modica febbre, esantema, ingrossamento delle ghiandole e mononucleosi. L'emocultura in Tarozzi-Noguchi, praticata ai bambini, generalmente verso il 15° giorno d'infezione sperimentale, dà sviluppo

ai medesimi germi isolati dagli ammalati di rosolia. Queste ricerche non hanno avuto sinora conferma alcuna e le obbiezioni ai reperti di Caronia acquistano anche qui analogo significato.

Morbo di filatow-dukes (*Quarta malattia*).

Secondo Dukes la quarta malattia starebbe alla scarlattina come la rosolia tipica al morbillo, e, come il quadro clinico di una rosolia tipica corrisponde quasi a quello di un morbillo leggero, la « quarta malattia » è simile alla cosidetta scarlattina abortiva, che si esplica con eruzione leggera e manifestazioni generali attenuate. L'autonomia della malattia e l'indipendenza tanto dalla scarlattina quanto dalla rosolia è stata affermata da Dukes in seguito alla osservazione di alcune epidemie decorse in pubblici istituti dove erano commisti casi di scarlattina con dei casi di « quarta malattia »: mentre in questi ultimi l'incubazione durava 14-15 giorni, le scarlattine si susseguivano coll'intervallo di 2-3 giorni. È caratteristico della quarta malattia il decorso in genere mite, la quasi completa assenza di complicazioni e postumi, la relativa rapida scomparsa della contagiosità e la lunga durata del periodo d'incubazione.

L'ampia serie di osservazioni cliniche inoppugnabili (Weawer, Unruh, Cotton, ecc.) permettono di stabilire esattamente che vi sono effettivamente delle epidemie miti dall'apparenza scarlattiniforme, che non risparmiano nemmeno quei bambini i quali hanno già subìto la scarlattina e la rosolia, e che viceversa non difendono i malati dal contrarre successivamente, la rosolia o la scarlattina.

Si ammette così oggi quasi concordemente l'autonomia di questa forma morbosa ed anche per parte mia in base all'osservazione personale sono convinto di averla osservata qualche volta.

Naturalmente il contributo risolutivo della questione ci verrebbe fornito dalla conoscenza dell'agente etiologico. Su questo tema la letteratura è completamente muta: non mi risulta che siano state riferite ricerche di natura etiologica.

Eritema infettivo (*Quinta malattia*).

È ancora discussa l'autonomia clinica di questa particolare forma morbosa che, segnalata a più riprese sotto forma epidemica, venne anche indicata con nomi diversi. Così sono sinonimi i termini: rosolia locale (Tschamer), megalerythema epidemicum (Plachte, Alberto Mug-

gia), esantema variabile (Pospischill) erythema simplex marginatum (Feilchenfeld), erythema infantum febrile (Tripke), risipola epidemica dei bambini (Tripke). È stato Escherich che per la prima volta, nel 1896, espresse il sospetto di una discussione avvenuta al Congresso di Mosca a proposito di una comunicazione di Tobeitz che si trattasse di una forma autonoma da tenere separata dalla vera rosolia. Già in precedenza Tschamer in Graz ne aveva descritto il quadro morboso che però interpretò come una manifestazione particolare di rosolia. Schmid sostenne (1899) in seguito in modo deciso l'autonomia di questa forma morbosa manifestatasi in Graz in forma epidemica. Dello stesso anno sono i lavori di Stiker e Berberich. Altre epidemie sono state ulteriormente descritte in Italia, in Russia, in America. Quasi concordemente è ormai ammessa l'indipendenza dell'eritema infettivo quale entità morbosa. Trattasi d'una malattia infettiva acuta, contagiosa, esantematica. Con fenomeni generali per lo più di poco conto e decorrente quasi sempre senz'altra manifestazione che la comparsa di un'eritema, che colpisce specialmente la faccia ed i lati esteriori degli arti con aspetto polimorfo, maculo-papuloso, oppure confluente; della durata di una settimana circa (in un mio nipote 12 giorni), con remissioni ed interruzioni più o meno lunghe, tanto da dare l'illusione della guarigione.

La malattia si presenta in epidemie di estensione limitata (quindici casi nell'osservazione di Taccone, 14 casi in quella di Schmid) oppure anche in forma sporadica. Le epidemie sono per lo più in rapporto colle epidemie di scarlattina, morbillo o rosolia. Il maggior numero delle epidemie riferite si è verificato in primavera e nell'estate. Sono maggiormente colpite le persone giovani (dai 2 ai 18 anni) sebbene non manchino osservazioni in adulti. Stratmann riferisce di un caso in un uomo di 41 anni e Schmid di un assistente della Clinica di Monaco, che contagiatosi in un reparto da una bambina, ha a sua volta contagiato un altro adulto addetto all'ospedale. Secondo Feer il quadro ematologico è simile all'eosinofilia anafilattica. Nei primi due giorni sovente modica leucopenia (3-7.000) per diminuzione dei polinucleati. Per lo più marcata eosinofilia (8-10 %, Weeber); i globuli bianchi variano ma vi è sempre una relativa linfocitosi, in confronto della scarlattina nella quale parimenti vi è l'eosinofilia. Le ricerche eseguite da Taccone e da Bocchini mettono chiaramente in rilievo come le modificazioni del quadro ematologico siano tutt'altro che costanti, e come l'eosinofilia esista solo in qualche caso: gli altri elementi della formula ematica non presentano nulla

di rimarchevole. Ricerche dell'agente etiologico della malattia sono state eseguite da Sticker (1900), da Herrick (1926), da Taccone (1927) e da Bocchini (1928), ma costantemente i risultati sono stati negativi. Le ricerche di Herrick vertono anche sui secreti del naso e della gola (*American Journal of Chil.* D. N. 4, 1926), Taccone ha tentato l'emocultura in periodo vario di malattia in 8 casi e in due ha ripetuto il tentativo all'inizio e verso il periodo terminale dell'esantema. La semina del sangue in quantità di 2-3 cm. cubici venne fatta in terreni comuni (brodo, agar, agar- ascite) e in terreni al sangue; in tre casi anche in anaerobiosi; Bocchini in cinque casi ha praticato l'emocultura oltre che nei comuni terreni anche in Tarozzi-Noguchi. Ulteriori osservazioni di Taccone (1928) su una epidemia ospitaliera (27 casi) e scolastica (56 casi) hanno permesso ricerche interessanti e originali, quali la capillaroscopia sull'ambito delle zone colpite da esantema, l'esame istologico della pelle e i tentativi di riproduzione sperimentale della malattia nell'uomo. Le prove di trasmissione con il sangue di ammalati e col trasporto delle mucosità faringee da faringe a faringe, pur non portando alcun contributo alla conoscenza diretta dell'agente etiologico, dimostrano *la natura infettiva della malattia e permettono di affermare l'esistenza di un virus presente nel sangue durante l'esantema e nella cavità naso-faringea.*

APPENDICE.

Esantema subitaneo di Zahorski-Hempelmann-Veeder o esantema critico di Glanzmann.

In appendice merita di esser ricordata questa strana forma morbosa propria dell'età infantile e più particolarmente del lattante, che segnalata dapprima nell'America del Nord in pubblicazioni che risalgono al 1913 (Zahorski) ed in parecchie successive, comincia a diffondersi anche in alcune regioni dell'Europa, come l'Ungheria (Bokay 1923) , la Svizzera (Glanzmann 1924), l'Italia (Gismondi 1925). La malattia si presenta sporadicamente oppure in piccole epidemie; Greenthal ha visto ammalarsi due fratelli e Glanzmann ha descritto due casi successivi nella stessa famiglia. Nulla è noto ancora circa la contagiosità. Sono colpiti a preferenza i lattanti da 6 mesi fino a 2 anni e mezzo.

L'inizio è per lo più brusco, la febbre sale rapidamente e può raggiungere i 40° e più, decorrendo a tipo continuo. La durata media della febbre è di 3 giorni, dopo i quali si ha una caduta critica, mentre in pari tempo si inizia la comparsa sul tronco di un'eruzione a tipo morbilliforme, che si estende rapidamente alla radice degli arti, al cuoio capelluto. Dopo circa 48 ore l'esantema scompare, senza dar luogo a desquamazione. L'esito è sempre buono.

Non esistono ricerche di natura etiologica. Una importante caratteristica ematologica di questa forma morbosa è stata messa in luce da Veeder ed Hempelmann: in tutta la durata del periodo febbrile si ha una leucopenia dovuta ad una fortissima diminuzione dei polimorfonucleati: la mononucleosi relativa che ne risulta può raggiungere cifre elevatissime, 75, 90 e in un caso persino il 98 %. Questo quadro ematologico è assai fugace e scompare rapidamente appena avvenuta la crisi o poco dopo. Sono stati osservati in aumento anche i metamielociti e le forme di passaggio; gli eosinofili sono in genere fortemente diminuiti. Gismondi, che per il primo ha segnalato in Italia la presenza di questa forma morbosa propone la denominazione di « sesta malattia » o di « esantema critico » osservando giustamente come quella adottata da Zahorski di esantema subitaneo non esprima nulla.

Nella mia pratica pediatrica mi si è offerta due volte l'occasione di porre la diagnosi di « esantema critico ». Il primo caso riguarda un bambino di un anno, che dopo un periodo di febbre elevata (39°-40°) insorta bruscamente con convulsioni e durata due giorni, presenta eruzione morbilliforme diffusa al tronco e particolarmente marcata al cuoio capelluto. Guarigione. Non desquamazione. In questo caso il decorso è stato assolutamente tipico: lo ritengo tuttavia dubbio potendolo anche interpretare come un'esantema tossico-medicamentoso: a scopo terapeutico erano stati praticati tre clisteri di salicilato di soda. Nel secondo caso, in bambino di 4 mesi, allattato al seno materno, si è avuto il decorso tipico, con febbre elevata, senza convulsioni, e l'insorgenza dell'esantema alla caduta critica della febbre. L'eruzione anche in questo caso era marcatissima al cuoio capelluto.

Come ho già detto non esistono ricerche etiologiche; pure mi è parso utile di richiamare l'attenzione su questa forma morbosa strana e poco nota, la cui conoscenza, portando all'identificazione anche dei casi sporadici, potrà offrire motivo a indagini sperimentali e culturali. (applausi).

Prof. Ottolenghi (Presidente). — Ringrazio vivamente il relatore, ma questi applausi ringraziano molto meglio delle mie parole il prof. Muggia per quanto egli ha esposto con tanta chiarezza e precisione. Prima di aprire la discussione su questa relazione credo opportuno che i prof. Canelli e Revelli facciano le loro comunicazioni che riguardano argomenti direttamente connessi con quelli di relazione.

Dà quindi la parola al Prof. A. Canelli per lo svolgimento della sua comunicazione:

Le prove dell'agglutinazione e della deviazione del complemento nell'etiologia della scarlattina.

Prof. A. Canelli: Le ricerche che io iniziai nel 1925, durante la mia frequenza all'Ospedale Amedeo di Savoia per le malattie infettive in Torino, sono state da me perseguite sino all'anno scorso.

Ricorsi alle prove dell'agglutinazione e della deviazione del complemento secondariamente — in ordine di tempo — ai risultati negativi — rimasti inediti — ottenuti su terreni culturali alla Tarozzi-Noguchi, secondo il sistema di Cristina, Caronia e Sindoni.

In quell'epoca il dottor Umberto Revelli allestiva la sua tesi di laurea sperimentale, informata alle ricerche degli autori suddetti. Io seguii, controllandole, le indagini del Revelli e conclusi che i corpiccioli del Di Cristina e Caronia non debbono essere considerati come gli agenti della scarlattina. Anzi, già allora avanzai il dubbio, riferito dal Revelli, che siffatti corpiccioli non fossero neppure esseri viventi. Soggiungo trattarsi verosimilmente di formazioni provenienti dalla cottura e dal disfacimento dei frammenti degli organi costituenti lo speciale terreno nutritizio, le quali possono avere le proprietà tintoriali descritte dal Di Cristina e dal Caronia, ma non obbligatoriamente.

Assodato questo punto importante della questione, iniziai, per estendere meglio le mie ricerche, le prove dell'agglutinazione e della deviazione del complemento, sollecitato in ciò anche da una pubblicazione del Mayer di Düsseldorf.

Dovendo esser breve, non posso fare appello alcuno alla letteratura esistente: d'altra parte essa è ben nota per il grande clamore polemico sollevato dalle conclusioni di Di Cristina e di Caronia.

Prove di agglutinazione. — Ho adoperato il terreno Tarozzi-Noguchi modificato da Caronia: ad una diecina di centimetricubici di

brodo citratato si aggiungono quattro centimetricubici di liquido ascitico e, dopo quarantott'ore di permanenza in termostato, alcuni pezzetti d'organo o di cavia o coniglio sani. Col materiale prelevato dalle pareti e dal fondo del tubo di coltura si allestisce in soluzione fisiologica fenicata al mezzo per cento un'emulsione opalescente, omogenea e senza grumi. A questo scopo devesi aver cura di stemperare bene, emulsionandolo, il materiale supposto bacterico e di filtrarlo parecchie volte traverso carta, badando di ottenere un'emulsione piuttosto densa.

Inseminavo i tubi culturali alla Tarozzi-Noguchi col sangue prelevato asetticamente dalla vena mediana di bambini scarlattinosi. La diagnosi clinica era accertata in modo perentorio.

Inoculavo le colture rigogliose per via endovenosa — alla dose singola di tre centimetricubici ripetuta tre volte — in conigli giovani, sani e robusti.

Ho provato l'agglutinazione a diverso titolo — da quello basso di 50 a quello di 500 — valendomi delle emulsioni suddette, in dieci bambini clinicamente scarlattinosi in maniera indubbia e negli stessi conigli iniettati, dopo quattro, otto, quindici giorni dalla terza iniezione culturale. Prelevavo il siero di sangue dai bambini in seconda, quinta, dodicesima, ventesima giornata di malattia.

Orbene, l'esito è stato concordemente e sempre negativo.

Tuttavia, di per se stesse queste prove agglutinanti non hanno grande significato probativo, perchè è noto come l'agglutinabilità delle singole specie bacteriche sia assai variabile, da quella massima del gruppo tifo-paratifo a quella minima dei meningococchi e degli streptococchi. Anche ammessa la natura bacterica dei corpiccioli di Di Cristina e Caronia, si poteva, verosimilmente, pensare ad uno scarso o nullo potere agglutinante della specie bacterica.

Prove di deviazione del complemento. — Mi sono valso dei sieri di sangue di individui clinicamente ben affetti da scarlattina parte inattivati e parte attivi, adoperando antigeni omologhi ed eterologhi, costituiti dalle colture suddette.

Ho prelevato i sieri di sangue nel secondo, nel quinto e nel ventesimo giorno di malattia. Gli antigeni erano sospensioni acquose clorurate del deposito granuloso dei tubi culturali ed estratti alcoolici del medesimo.

Una parte delle prove sono state inoltre ripetute negli stessi individui al termine della malattia, vale a dire appena appena risolta la desquamazione.

Non regolarmente, ma spesso ho eseguito i controlli, valendomi di sieri di sangue di individui normali, i quali non avevano ancora superato la scarlattina.

Tutti i sieri di sangue hanno mostrato di non poter deviare il complemento, in generale. Scrivo così, perchè in qualcuno l'emolisi è stata, in realtà, incompleta, senza per altro poter comprendere se avessero influenza l'attivazione o l'inattivazione, l'antigeno omologo od eterologo.

La tecnica usata è stata quella della reazione di Wassermann, adoperando come antigeni i liquidi testè descritti.

Mi ero prefisso di poter controllare, anche indirettamente, i risultati di Di Cristina e Caronia, incoraggiato dai tentativi che stavo facendo in maniera analoga sulla varicella e da me pubblicati nel 1927.

Come avviene per la varicella, la quale indubbiamente sia pure assai di rado può decorrere senza esantema, così io speravo di poter ancora con le mie ricerche delucidare quei casi clinicamente assai dubbi e miti di scarlattina e che pure hanno, in pratica, grande importanza per la profilassi.

Ho avuto agio di studiare e di riprendere in esame le prove sierologiche molteplici volte nello stesso individuo in otto bambini; ma non ho potuto mettere in evidenza come nel sangue degli scarlattinosi esistono degli anticorpi specifici riconoscibili mercè il metodo della deviazione del complemento, di fronte agli antigeni testè descritti.

Coi risultati negativi alla mano secondo il metodo da me seguito, tre ipotesi si possono avanzare. O non esistono gli anticorpi specifici nel sangue degli scarlattinosi, il che è inammissibile. O gli antigeni, benchè accuratamente preparati, sono specificamente nulli, il che è probabile. O la tecnica è difettosa, la qual cosa è di certo possibile, ma poco probabile.

Ad ogni modo, di per se stessa, anche la prova della deviazione del complemento non dà risultati probativi, come quella dell'agglutinazione.

Tuttavia, se teniamo conto e del reperto bacteriologico — sull'esito del quale insisto ancor oggi — e delle prove biologiche sperimentali e degli esami d'agglutinazione e della deviazione del complemento, si può concludere che la etiologia della scarlattina non è chiarita affatto dalle ricerche, per altro geniali e diligenti, del compianto Di Cristina e del Caronia.

Il *Presidente* prega il Dott. U. Revelli di svolgere la sua comunicazione:

Ricerche sull'etiologia della scarlattina.

Dott. U. Revelli: Ho eseguito ricerche sistematiche sull'etiologia della scarlattina sia controllando i dati di vari altri autori, sia seguendo un metodo personale di indagine.

Nei casi di scarlattina tipici si isola costantemente dal muco orale e da essudati di complicazioni scarlattinose, e con relativa minor frequenza dal sangue, uno stipite di streptococco emolitico per il sangue di uomo e di coniglio che, oltre ad una grande resistenza e vitalità (è sufficiente per mantenerlo in vita il trapianto ogni tre mesi) offre la peculiare caratteristica di svilupparsi ottimamente anche a temperature basse di 10°-12°. Tale streptococco isolato di recente ed inoculato nel coniglio mostra un grado più o meno notevole di virulenza inquantochè cagiona o la morte rapida dell'animale con un quadro patologico caratteristico (convulsioni e poi fenomeni di paralisi generale e parziale) accompagnato da elevazione termica di due o tre gradi od un quadro di cachessia con desquamazione e talora perdita del pelo ad esito letale in un periodo da 20 giorni ad un mese e ciò a seconda della dose inoculata e la via di inoculazione.

L'emocultura dei conigli trattati rivela la presenza esclusiva di streptococchi. Le squame dei conigli insemenzate in vari terreni colturali sia liquidi che solidi in aerobiosi ed anaerobiosi (brodo-ascite, agar-sangue, agar sangue con Bacterium prodigiosum in piastra chiusa con la plastilina) hanno dato sviluppo a streptococchi patogeni per il coniglio.

Il muco orale di scarlattinosi filtrato attraverso candela Berkefeld V. o W., la cui integrità è stata sempre controllata inquinando ad arte il muco con Bacterium prodigiosum ed inoculato nei conigli giovani cagiona per lo più un quadro patologico di cachessia con febbre elevata, accompagnata dopo 15-20 giorni da una desquamazione netta e talora da perdita del pelo. La morte di questi conigli avviene dopo un minimo di 20 giorni ad un massimo di 50. Tuttavia alcune volte sopraggiunge in 4 o 5 giorni ed in questi casi non si osserva il quadro su menzionato.

L'emocoltura dei conigli così trattati dà luogo quasi sempre allo sviluppo esclusivo di streptococchi. Le piccole dosi frazionate del filtrato di muco orale di scarlattinosi inoculate nei conigli li immunizzano di fronte a dosi letali di streptococco scarlattinoso.

Il filtrato di muco orale di scarlattinosi o di essudati di complicazioni scarlattinose, insemenzato in terreni colturali sia liquidi che solidi in aerobiosi od in anaerobiosi (brodo-ascite, agar sangue, agar sangue + prodigioso, Tarozzi Noguchi, Tarozzi Noguchi modificato da Caronia) può dar luogo allo sviluppo di streptococchi patogeni per il coniglio. Lo sviluppo avviene sia a temperatura ambiente sia in termostato a 37°.

Lo streptococco così isolato oltre a presentare un polimorfismo notevole (catenelle con elementi di grandezza e numero variabili) offre ancora in sommo grado quella peculiare caratteristica osservata negli stipiti di streptococco isolato e dal muco orale e dal sangue a cui ho accennato poc'anzi e cioè di svilupparsi ottimamente a temperature basse fino a 10-12 gradi e di possedere una grande resistenza e vitalità tanto da potersi mantenere vivo e virulento in brodo ascite sino a 3 mesi senza che si rendano necessari trapianti.

Gli streptococchi uniti a filtrato di muco orale non si dimostrano più virulenti per il coniglio di quanto possa essere la sola coltura di streptococchi.

Le proprietà biochimiche degli streptococchi isolati sia dal filtrato di muco orale sia dall'emocultura del coniglio trattato col suddetto filtrato non si differenziano da quelle osservate negli streptococchi isolati direttamente dalle fauci o dal sangue dello scarlattinoso.

Le colture di streptococchi isolati dal muco orale, dal sangue e da essudati di complicazioni scarlattinose filtrate attraverso candela Berkefeld V. o W., la cui integrità è stata sempre controllata mediante inquinamento della coltura con Bacterium prodigiosum, inoculate nei conigli cagionano in molti casi la stessa serie di fenomeni che ho descritto per il filtrato di muco orale riuscendo al tempo stesso ad isolare dall'emocultura degli animali lo strepto. Mi è stato così possibile ottenere in serie il seguente fenomeno: inoculazione del filtrato di muco orale in un primo coniglio; isolamento dal sangue del medesimo dello streptococco; inoculazione in un secondo coniglio del filtrato della brodo-ascite coltura degli streptococchi isolati e così di seguito sino al quarto passaggio nel coniglio.

L'insemenzamento del filtrato di coltura di streptococchi in vari terreni colturali sia solidi che liquidi, ha dato qualche volta lo sviluppo di streptococchi, patogeni per il coniglio.

Ho fatto numerose ricerche sistematiche sull'agglutinabilità degli streptococchi da me isolati sia di fronte al siero di ammalati di

scarlattina, sia di fronte al siero di animali trattati con tali streptococchi o con filtrato di muco orale di scarlattinosi o con filtrati di essudati di complicazioni scarlattinose.

A tale fine io ho eseguito diverse prove crociate, saggiando con uno stesso siero parecchi stipiti e viceversa con uno stesso stipite diversi sieri umani e di animali. Per le sospensioni batteriche mi sono servito di colture in brodo o brodo ascite, centrifugate e lavate parecchie volte con soluzione fisiologica.

Dall'insieme delle osservazioni risulta innanzitutto che anche per gli strepto isolati dallo stesso malato vi sono differenze di agglutinabilità da parte dello stesso siero nel senso che gli streptococchi isolati dalla cavità orale sono un po' meno agglutinabili degli strepto isolati dal sangue. Vi sono inoltre delle differenze tra gli streptococchi isolati dal filtrato di muco orale di scarlattinosi e lo streptococco isolato dal sangue del coniglio inoculato prima con questo materiale.

Risulterebbe dunque una tendenza dello streptococco scarlattinoso a variare la sua agglutinabilità durante il suo sviluppo a seconda dell'ambiente ove si trova.

Si avrebbe così un'agglutinabilità discreta dello streptococco isolato dal muco orale ed un'agglutinabilità più grande dello stesso strepto isolato dal sangue dello scarlattinoso all'acme del periodo esantematico e febbrile e di nuovo una meno grande agglutinabilità dello strepto con il passaggio in vitro e nel coniglio. Come valore massimo ho ottenuto un'agglutinazione con sieri diluiti sino a 1 : 800.

Noto ancora che il siero di coniglio, trattato con filtrato di muco orale ha presentato un potere agglutinante per lo streptococco scarlattinoso sino a diluizione 1 : 800.

Io non ho osservato, contrariamente a quanto altri affermano, che lo streptococco scarlattinoso unito ad altri germi (tifo) comunichi ad essi la proprietà di essere agglutinati dal siero agglutinante anti-streptococcico.

Venne eseguita la ricerca del fenomeno di Shultze-Chartlon con sieri di convalescenti di scarlattina, con sieri di conigli inoculati con filtrato di muco orale di scarlattinosi, con sieri di conigli inoculati con streptococchi scarlattinosi, con siero antistreptococcico polivalente. Dagli esperimenti sinora eseguiti ho ottenuto una positività abbastanza costante per i primi tre tipi di siero.

CONCLUSIONE.

Dall'insieme di questi dati a me risulta fuori di ogni dubbio che lo streptococco da me isolato negli scarlattinosi ha un'azione sullo svolgimento della malattia. Quanto al significato etiologico di questo germe si prospettano due ipotesi: l'una che la scarlattina sia dovuta ad un virus filtrabile e lo streptococco non rappresenti altro che un germe di sortita sia pure necessariamente associato a detto virus.

L'altra ipotesi sarebbe che l'agente etiologico della scarlattina sia lo streptococco.

Il fatto poi che questo germe: 1° non sempre si possa isolare dal sangue; 2° che il filtrato di muco orale privo di streptococchi dia nel coniglio costantemente il quadro morboso descritto ed il terzo fatto ancora che alcune volte si è riusciti in vitro ad ottenere lo sviluppo di strepto da filtrato di muco attraverso candela indurrebbe a pensare, se si vuole accettare la 2ª ipotesi, che a rigore la scarlattina sia dovuta ad una fase di vita dello streptococco non ancora ben conosciuta, fase nella quale lo strepto sarebbe invisibile e filtrabile.

Questa ipotesi che sin dal mese di giugno dell'anno scorso venne da me prospettata in una nota pubblicata nel Bollettino della Società Internazionale di microbiologia sarebbe altresì suffragata dal fatto che il filtrato di coltura streptococcica del pari del filtrato di muco orale riesce in vivo a determinare una streptococcemia mortale nel coniglio con le caratteristiche alterazioni cutanee descritte. Si tratta forse di una fase di vita dello streptococco per la quale è indispensabile la vita nell'organismo animale.

Discussione.

Prof. ZIRONI. – Poichè il prof. Azzi ci invita gentilmente a discutere come in famiglia, io vorrei ricordare alcuni dati che ho ottenuto insieme col prof. Tron qualche anno fa a proposito di ricerche di controllo fatte in Italia sopra il famoso microrganismo di Di Cristina-Caronia. Noi abbiamo insemenzato molte volte con sangue di scarlattinosi dei terreni di Cristina-Caronia e non abbiamo mai avuto lo sviluppo di nessun microrganismo. Le ricerche venivano fatte con la maggior diligenza ed i terreni culturali insemenzati venivano tenuti in esame per un lungo periodo di tempo; Non ricordo bene quanto, ma mi pare che per una ventina di giorni li tenessi in termostato. Noi non avevamo assolutamente nessuno sviluppo di microorganismi, e perciò non isolammo mai alcuno streptococco dal sangue di scarlattinosi fortemente febbricitanti.

E questo ci pare un dato di fatto interessante. Abbiamo fatto anche una piccola serie di ricerche di insemenzamento nei terreni nutritivi di Di Cristina-Caronia, o Tarozzi-Noguchi, di filtrati di squame e di filtrati di muco faringeo di scarlattinosi. L'insemenzamento veniva fatto con abbondante quantità di filtrato tenuto al termostato a 37°, ma anche in questo caso il risultato fu sempre negativo. Siccome l'esame dei preparati microscopici nel terreno Tarozzi-Noguchi è quanto mai fastidioso e non si presta a dare dei risultati bene leggibili, così noi, per giudicare della sterilità rispetto ai microrganismi banali, eseguivamo sempre dei trapianti in agar-siero, agar-ascite, agar-comune; e abbiamo sempre avuto risultati negativi.

Ora dato che le interessantissime ricerche del collega Revelli, pongono il problema sotto una luce nuova, a conciliare i dati discordanti, dato che noi vogliamo discutere proficuamente, bisognerebbe vedere quali sono per esempio le modalità di insemenzamento seguite dal collega Revelli, modalità che dovrebbero essere esposte nei più minuti particolari per poter permettere a tutti di controllare le sue interessantissime ricerche, che possono portare una gran luce nel problema della scarlattina.

Pregherei quindi il collega di voler precisare la tecnica usata nel modo più minuzioso e più esatto.

Presidente. — La parola al Prof. Stazzi.

Prof. Stazzi. – Interloquisco in una quistione nella quale non ho specifica competenza, ma lo faccio unicamente per ricordare alcuni dati che non credo privi di interesse che desumo dalla patologia veterinaria.

Intanto debbo io pure asserire come sia tutt'altro che raro in animali trattati con virus od antigeni diversi separare dal sangue streptococchi; nel cavallo ad es. il reperto di streptococchi nel sangue è comunissimo, e fu probabilmente questo reperto così facile e comune causa di errori nella determinazione eziologica di affezioni diverse del cavallo.

Circa le forme filtrabili dello streptococco e la loro importanza nell'eziologia della scarlattina ricordo come in riguardo alla peste del maiale ci sia stato chi ha sostenuto come il bacillo suipestifere potesse nel suo polimorfismo avere forme filtrabili, e che il virus della peste potesse essere in queste forme filtrabili del b. suipestifere, appunto rappresentato. Il fatto come è noto non fu poi confermato.

Sono alquanto scettico circa la vera filtrabilità di alcuni germi come lo streptococco anche perchè per mia pratica conosco bene come le candele porose riservino non piccole sorprese. Talchè io che debbo per necessità studiare parecchi virus filtrabili delle malattie del bestiame, per prevenire tali sorprese ho dovuto adottare questa tecnica, che riconosco non è perfetta: aggiungere al materiale di studio virus della peste dei polli e colture virulentissime del colera dei polli saggiando poi il filtrato negli animali d'esperimento (galline, piccioni e conigli).

Quanto all'osservazione del Dr. Tron che vaccini a base di streptococchi hanno dato buoni risultati nella scarlattina, faccio presente, sempre desumendo dalla patologia comparata che in certe malattie del bestiame da virus filtrabile (cimurro del cane) vaccini preparati con streptococchi di irruzione secondaria danno risultati curativi non indifferenti.

Presidente. — La parola al Prof. G. Segre.

Prof. G. Segre. – Poche parole per sottolineare da un punto di vista chirurgico, che è quello che mi interessa, ciò che ha riferito il dott. Revelli ed unicamente per mettere in risalto la possibilità autentica che l'etiologia della scarlattina sia nello streptococco o in una fase dello streptococco, come mi è risultato da esperimenti numerosi che ho fatto nell'Istituto del prof. Azzi, per altri intendimenti, durante i quali ho inoculato una quantità enorme di conigli con iniezioni intravena di culture di streptococchi per studiare poi il modo di curare l'infezione streptococcica generalizzata, sia con trapianti di midollo osseo di coniglio, sia con trapianti di organi vari. Ora il lato interessante della questione ai fini di questa discussione è questo: che tutti i conigli che ho inoculato — naturalmente faccio astrazione da quelli che sono morti di setticemia acuta — in relazione agli scopi delle mie esperienze, sono tutti guariti. In questi conigli ho sempre verificato, nel periodo della convalescenza, quando già la coltura del sangue prelevato dal cuore era negativa, una abbondantissima desquamazione e dalle squame ho sempre isolato lo streptococco; quindi ho ritrovato nel periodo di guarigione quelle condizioni cliniche della scarlattina che si potevano riferire al germe scarlattinoso, di cui io avevo avuto il primo ceppo, che con successivi trapianti avevo conservato e adoperato per le mie esperienze. Quindi, conferma clinica e batteriologica della desquamazione di animali, i quali hanno avuto la inoculazione di streptococchi ripetutamente passati attraverso a diversi terreni di coltura e streptococchi che inoculati a questi animali — portati a guarigione — hanno dato però i sintomi finali della malattia.

Prof. Favilli. – Non desidero entrare in merito alla questione etiologica della scarlattina e dell'importanza dello streptococco come agente etiologico; voglio soltanto fare un piccolo rilievo a proposito di quanto ha detto il dottor Revelli circa la filtrabilità degli streptococchi, argomento molto discusso, oggi all'ordine del giorno, e per il quale vi sono moltissime ricerche in proposito. Se si fa una scorsa bibliografica diligente si constata subito un fatto: che i diversi reperti sono completamente discordanti. Anche gli autori che sostengono la filtrabilità dello streptococco riferiscono dei dati che non si sa bene come mettere in rapporto tra loro. Oltre questi dati così incerti ce ne sono altri assolutamente negativi, e fra questi io vorrei ascrivere anche i miei. Ho eseguito molte filtrazioni di streptococchi, nelle più svariate condizioni, e usando stipiti differenti, isolati di recente e da tempo e ho avuto risultati sempre ne-

gativi. Quanto poi a quello che ha detto il Dott. Revelli a proposito della possibilità di sviluppare una streptococcemia con inoculazioni in conigli di filtrato di streptococchi, desidero far rilevare quanto ha messo in luce Burnet con esperienze molto precise. Burnet ha visto che l'insorgenza della streptococcemia nel coniglio è molto frequente: questa setticemia può insorgere non soltanto per l'inoculazione di filtrato di streptococchi ma anche in seguito ad inoculazione di sostanze tossiche della più svariata natura che niente hanno a che vedere con la tossicità dei filtrati dello streptococco. Lo streptococco non sarebbe quindi che un germe di sortita così che anche la possibilità di insorgenza di setticemia in seguito alla inoculazione di filtrato, che potrebbe far pensare alla possibilità che queste forme ultravisibili prendano soltanto parvenza morfologica in vivo, vuole essere accettata oggi almeno con le dovute riserve.

Presidente. — Il Prof. Carbone ha facoltà di parlare.

Prof. Carbone. – Non ho obbiezioni da fare, tanto più che non ho lavorato in argomento. Voglio solo domandare questo: dato che i comunicanti pensano che la trasformazione del germe microscopico coltivabile, in questo virus filtrabile, avvenga in vivo, e dato che si prospetta la possibilità che in vivo un intervento qualunque che danneggi l'organismo del coniglio provochi una mobilitazione di streptococchi già contenuti nell'organismo (e che potrebbero non esserci nel coniglio sano, od esservi rari, tanto più che noi diciamo sano, ma non sappiamo poi se qualcuno dei nostri conigli « sani » non soffra di qualche cosa, e potrebbero invece esservi nel coniglio offeso sia da questi filtrati, sia eventualmente da quegli altri tossici cui ha accennato il prof. Favilli) io domando se non si è pensato e se non si è tentato di ricorrere a quel *quid medium* fra il terreno di cultura e l'organismo vivo, che sono i tessuti coltivati in vitro, di cui si può naturalmente controllare la sterilità con lo stesso criterio con cui si controlla un terreno di coltura qualunque, e quindi si potrebbe escludere la preesistenza dello streptococco in essi e coltivare in essi i filtrati. Mi pare così di dare una idea che potrebbe anche darsi aprisse la strada: o il tessuto coltivato in vitro, o anche il sangue tenuto in vitro sul tipo delle culture dei parassiti malarici ecc., che si fanno appunto in presenza di sangue integro in vitro.

Prof. Azzi. – L'osservazione del prof. Favilli è degna della massima considerazione molto più che ci troviamo di fronte a fatti non ancora bene chiariti e a quesiti, che restano sempre nel campo delle ipotesi, soltanto faccio presente che sarebbe opportuno sapere, se in seguito all'inoculazione del materiale streptococcico si è osservato nel coniglio inoculato anche una caratteristica desquamazione verificatasi dopo parecchio tempo dall'introduzione della sostanza tossica e se dalle squame dello stesso coniglio si è isolato lo streptococco, con tutti i caratteri indicati dal Revelli. Approfitto ancora della parola ottenuta per fare una dichiarazione: le ricerche del Revelli erano già in parte co-

nosciute attraverso le pubblicazioni da lui fatte nel bollettino della nostra Società, ma io ho pregato il mio collaboratore Revelli di venire a portare qui i risultati delle sue ricerche per suscitare un po' di interesse alla questione. E avrei proprio piacere che si discutesse ancora ulteriormente su questo argomento tanto più che lo scopo della nostra riunione è quello di prepararci per il prossimo congresso internazionale di Parigi; è bene che noi italiani ci troviamo ben preparati per fare una figura degna della nostra nazione all'estero. Per ciò pregherei veramente i colleghi presenti a voler prendere maggiore interesse a questa questione. A me pare che i dati del Revelli per quanto si vogliano accogliere con tutte le riserve, abbiano qualche fondamento di vero e siano degni di essere presi in una certa considerazione. Il fatto, dunque, che il filtrato di muco di scarlattinoso inoculato nel coniglio cagiona streptococcemia costante, che, dopo parecchio tempo, se il coniglio non muore, si forma una costante desquamazione epidermica con manifestazioni cutanee scarlattiniformi e con la presenza in esse dello streptococco sovradescritto, il fatto — e questo mi pare più importante — che questo tipo di streptococco coltivato in vitro non sempre riesce filtrabile (lo sviluppo nel filtrato dello streptococco è una cosa quasi eccezionale) mentre invece, inoculato in vivo costantemente riproduce streptococcemia con desquamazione del pari a quanto cagiona il filtrato di muco di scarlattinoso induce a far prendere in seria considerazione l'ipotesi che si tratti di una fase filtrabile dello streptococco, ma obbligata in vivo. Perchè pensare ad un virus indipendente, dal momento che lo streptococco in un modo o nell'altro entra in causa nella scarlattina, sia che lo si voglia considerare come un germe casuale di sortita o piuttosto come germe obbligato di sortita?

A me pare, adunque, che l'ipotesi di riferire la scarlattina ad una fase filtrabile, invisibile obbligata in vivo dallo streptococco sia la più semplice e come tale la prospetto ai colleghi perchè vogliano discuterla.

Prof. Brusa. – Voglio chiedere a scopo d'istruzione personale, perchè non sono molto addentro in questi esperimenti, e perchè non se ne è parlato, se la reinoculazione di questo filtrato porta al coniglio una immunizzazione, perchè nel bambino la scarlattina, dà una certa immunità.

Prof. Guardabassi. – Nei riguardi del morbillo, del quale specialmente mi sono occupato, debbo dire di avere ottenuto i medesimi reperti del Revelli, non sono cioè riuscito ad accertare nei mezzi di cultura impiegati dal Caronia, seminati o no con materiale morbilloso, nessun germe, che differenziandosi dalle forme granulari proprie dei mezzi medesimi, potesse essere identificato con un quid vivente. Mi risulta che nella stessa scuola del Caronia non si era in grado di ravvisare i microrganismi su strisci da mezzi di cultura seminati o no. Non posso quindi avere alcuna fiducia nei reperti del Caronia.

Quanto alla filtrabilità dello streptococco e alla importanza che potrebbe avere nella eziologia della scarlattina, vorrei rammentare che ancora un'altra

difficoltà si presenta allo sperimentatore, che voglia dimostrare la filtrabilità di tale germe: ossia la frequenza, già notata da Palante ed altri AA., con la quale anche nel coniglio normale l'emocultura dà esito a streptococchi.

Prof. Tron. – Il prof. Zironi ha parlato delle ricerche di controllo sul microrganismo di Di Cristina e Caronia. Numerosi lavori sono stati pubblicati in Italia ed all'estero, tutti nel senso di non riconoscere ai corpuscoli di Di Cristina e Caronia nelle culture il valore non solo di agenti della scarlattina, ma neppure di entità viventi, e quindi mi pare che la maggioranza dei ricercatori sia d'accordo nel ritenere che nessun valore si debba oggi conferire etiologicamente a queste formazioni, per quanto recentemente si sia visto che qualche autore russo è venuto in appoggio alle vedute di Caronia e di Di Cristina. In quanto alla scoperta dei Dick, bisogna dire che questa scoperta ha portato una rivoluzione profonda nella concezione della scarlattina perchè ne ha sviluppato molto la parte serologica, la parte immunitaria, e non soltanto la parte batteriologica. A me pare che in questa parte immunitaria, nella sieroterapia, vi sia qualche cosa che dimostra che lo streptococco dei Dick e la sua tossina, sono in rapporto stretto colla scarlattina. Non parlo solamente delle prove, dei risultati della sieroterapia antiscarlattinosa con il siero di Dick, perchè questa sieroterapia ha dato ottimi risultati come avevano dato ottimi risultati altri sieri, ma c'è un fatto che mi pare debba essere considerato in modo speciale: voglio accennare al fenomeno dello spegnimento dell'esantema scarlattinoso. Noi sappiamo che alcuni sieri umani, con una proporzione all'incirca del 30%, sono capaci di spegnere l'esantema scarlattinoso in atto, mentre nessun siero animale è capace di farlo. Numerose ricerche sono state fatte da vari autori, ed anche da me stesso, vari anni fa, sul fenomeno di Schultz e Charlton. Ora era risultato che i sieri animali, di cavallo, siero antitetanico, siero antidifterico, non avevano mai potuto spegnere l'esantema scarlattinoso. Invece il siero dei cavalli, trattati con le tossine dello streptococco dei Dick acquista qualche volta questo potere sicchè noi possiamo talvolta dimostrare col siero sperimentale antiscarlattinoso un netto spegnimento dell'esantema scarlattinoso che non si differenzia da quello che otteniamo con siero umano. Ebbene, questo fatto presenta un interesse del tutto particolare perchè se questo siero di cavallo che sappiamo in condizioni normali non può spegnere l'esantema, acquista questo potere, vuol dire che è intervenuto qualche fattore di natura specifica. Ci sono altri argomenti che potrebbero essere portati in appoggio della teoria dei Dick che derivano anche dalla pratica della vaccinazione. Le vaccinazioni antiscarlattinose fatte hanno preservato fino ad un certo punto dalla scarlattina: questi sono argomenti che non hanno un valore decisivo (ben lungi!) nè io vorrei darglielo, ma però qualche elemento di giudizio noi possiamo avere anche da questa parte. Gli esperimenti che ho fatto a Milano sono troppo recenti e non possono ancora dar luogo naturalmente ad un esame sereno e definitivo della questione; però qualche cosa abbiamo già visto. Nel corso dell'anno scolastico abbiamo avuto a Milano una riacutizzazione, una riaccensione, abbastanza intensa dell'endemia scarlattinosa

che si verifica ogni anno. Orbene, nella endemia di quest'anno sono state colpite alcune scuole e tutti quelli che hanno pratica di questa malattia infettiva, sanno che quando la scarlattina si manifesta in una scuola non determina una grande esplosione di casi simultanei, ma provoca uno stillicidio che continua per mesi e mesi e che dura generalmente fino alla chiusura delle scuole, fino al termine dell'anno scolastico, cioè fino al mese di maggio o di giugno. Noi siamo abituati a vedere questi stillicidi che non si fermano più quando sono cominciati in una scuola.

Quest'anno io sono intervenuto in parecchie scuole ed ho vaccinato sino adesso circa seimila bambini con un vaccino allestito dall'Istituto Sieroterapico Milanese, costituito dalla tossina dei Dick e da streptococchi: un vaccino misto, non solamente antitossico, ma antitossico e antibatterico. Orbene, ho osservato fino ad ora, cosa abbastanza interessante, che nelle scuole dove siamo andati a vaccinare, l'epidemia o endemia, diremo meglio, è rapidamente cessata, dopo una decina di giorni, di applicazione del vaccino. Devo dire che facciamo delle vaccinazioni nasali perchè le iniezioni ipodermiche dei vaccini scarlattinosi, come loro tutti sanno, danno sempre origine a qualche piccolo incidente, ragione per cui nel campo scolastico non li possiamo per ora impiegare.

Noi, dell'Ufficio d'Igiene, rappresentiamo non degli istituti di esperimento, ma degli istituti di profilassi e quindi dobbiamo operare con dei mezzi sicuri. Per tali ragioni ho scartato l'idea della vaccinazione per mezzo di iniezioni ipodermiche ed ho vaccinato i ragazzi per mezzo di polverizzazioni nasali, che si prestano molto bene. Orbene finora, per quanto si tratti di risultati che non si possono considerare definitivi, non di meno mi pare che possiamo segnalare qualche cosa di interessante e cioè che abbiamo potuto troncare il consueto stillicidio dei casi di scarlattina nelle scuole colpite dall'endemia nelle quali abbiamo praticato la vaccinazione antiscarlattinosa per via nasale.

Prof. Morelli. – A proposito dei rapporti fra lo streptococco emolitico e la scarlattina mi sembra non si sia sufficientemente insistito sulle esperienze di inoculazione sperimentale della scarlattina all'uomo.

Oltre alle prove dei Dick, i quali riprodussero questa forma morbosa in tre volontari, sono da segnalarsi le ricerche di Nicolle, Conseil e Durand, i quali, in seguito a pennellazioni tonsillari di uno streptococco isolato dalla gola di uno scarlattinoso, dopo sette passaggi su agar, videro comparire la scarlattina in un volontario.

Assai dimostrativo mi sembra anche un'errore di laboratorio commesso nel 1901 all'Istituto Pasteur di Varsavia; dove fu adoperato, per le vaccinazioni antirabiche un coniglio cui era stato iniettato uno streptococco isolato da un caso di scarlattina. Orbene di 12 persone vaccinate con questo materiale 5 contrassero la malattia.

Tali esperienze eseguite a distanza di tempo da ricercatori indipendentemente l'uno dall'altro, mi sembrano deporre in maniera sicura per un rapporto

strettissimo fra lo streptococco e la scarlattina, sia essa provocata da uno stadio di sviluppo filtrabile del germe, sia che quest'ultimo rappresenti soltanto il portatore del virus scarlattinoso.

Prof. Azzi. – So che può capitare qualche volta che in un coniglio normale si trovino degli streptococchi, ma io confesso che pur allestendo quasi giornalmente dei terreni di agar-sangue per tanti scopi, servendomi di sangue di coniglio, ben di rado mi è avvenuto di trovare streptococchi in quei terreni. Non si può accusarmi di lavorar male: tutt'al più mi si potrebbe accusare di imperizia, se avvenisse il contrario, nè è il caso di pensare che solo i conigli di Torino non abbiano di abitudine lo streptococco nel sangue. Oltre a ciò, se casualmente si può sorprendere qualche raro streptococco nel sangue circolante del coniglio, si tratta sempre di condizioni eccezionali e momentanee, mentre i conigli inoculati con filtrato di muco o di culture di streptococco tutti senza eccezione ammalavano e morivano.

Quanto ai filtri è bene che ci intendiamo: le candele da filtro sono quelle che sono: è la solita questione: filtra, non filtra? Comunque a titolo di controllo si aggiunge alla sospensione di Bact. « prodigiosus » del muco orale, senza contare la svariata flora microbica della bocca sempre presente. Prendo nota dell'osservazione del Prof. Stazzi di ricorrere ad altri controlli di filtrabilità (virus pestis gallinarum, etc.), ma, ritengo impossibile che proprio tutte le candele non rispondessero allo scopo. In ogni modo ringrazio delle osservazioni fatte perchè sono venuto qua appositamente per discutere e trarre dalla discussione motivi per ulteriori ricerche. Non vedo, però, dalle obbiezioni mosse ragioni che valgano a scartare l'ipotesi che abbiamo prospettata e che mi pare debba andare ulteriormente svolta. Mi compiaccio per quanto hanno riferito il prof. Tron e la prof.ssa Morelli, i quali fino ad un certo punto vengono a convalidare la nostra tesi.

Prof. G. Brotzu. – Conosciute le esperienze del Revelli ho voluto controllare utilizzando i casi di scarlattina che si presentavano all'Ospedale Pediatrico Gozzadini di Bologna. Le esperienze sono ancora poche: una diecina circa.

Mentre in tutti i casi ho potuto isolare lo streptococco emolitico dalle fauci dei malati, le prove di filtrabilità di esso sono state finora negative, similmente a quanto ha ottenuto il Favilli

Debbo poi osservare che nelle ricerche del Revelli riferite dal Bollettino della Soc. di Microbiologia si parla di filtrabilità attraverso candele Berkefeld V. e W. Siccome mi è capitato di osservare talvolta la filtrabilità di altri germi attraverso le V, che sono notoriamente le più permeabili, sarebbe interessante conoscere quante volte sono state usate le V e quante le W.

Quanto all'osservazione che nel coniglio normale sia facile ritrovare lo streptococco emolitico, debbo osservare che ciò non mi è realmente mai avvenuto, per cui non mi pare che tale obbiezione possa aver valore per diminuire l'importanza delle ricerche del Revelli.

Prof. Azzi. – Il fatto della filtrabilità o no delle candele è relativo: la verità è che il Revelli filtrando materiale scarlattinoso o di coltura o di muco ha ottenuto un filtrato nel quale non si sviluppano streptococchi, ma che, inoculato in vivo, cagionava una sindrome del tipo della scarlattina. Più che la filtrabilità importa questo: che esiste uno stadio invisibile dello streptococco, durante il quale non è estinta l'azione patogena in vivo.

Prof. Casagrandi. – Veramente non volevo prendere la parola: ma ciò che ha chiesto il prof. Carbone mi obbliga ad intervenire nella discussione per informare che già da qualche anno nell'Istituto di Igiene dell'Università di Padova abbiamo istituito la coltivazione dei tessuti in vitro con la sub direzione del mio aiuto Dott. Sepilli. Prima di adire a questa coltivazione io avevo tentato la coltura del virus vaccinico nei leucociti viventi (con un metodo che ho varie volte descritto e che non starò qui a ripetere) e più recentemente anche quella di filtrati di materiale scarlattinoso. Il risultato è stato questo nella sua obbiettività: che dentro alcuni leucociti viventi ho trovato dei corpuscoli che ho identificato con i *corpuscoli di Amato*. Ecco quello che abbiamo trovato.

Dott. Revelli. – Al prof. Favilli che parla di azione tossica del filtrato indipendente dal contenuto del virus, forma filtrabile dello streptococco, che determinerebbe la sindrome nel coniglio mi permetto far osservare che in nessun altro caso è possibile riprodurre nel coniglio stesso il quadro summenzionato; esistono d'altra parte lavori di varî autori che appunto per eliminare questa eventuale azione tossica del filtrato, hanno eseguito le loro ricerche soffregando una zona di cute depilizzata con filtrati di prodotti scarlattinosi, riuscendo ad ottenere l'identico quadro patologico. Verrebbe in tal modo a cadere l'obbiezione del prof. Favilli, poichè non è più ammissibile che la minima quantità di sostanze tossiche che possono penetrare attraverso la via cutanea, sia in grado di determinare le alterazioni caratteristiche nel coniglio.

In quanto all'immunità che determinano piccole dosi di filtrato di materiale scarlattinoso inoculate nel coniglio, aggiungerò che questa non si esplica immediatamente dopo l'inoculazione ma solo dopo un numero vario di giorni (30-40 giorni); il siero acquista in questo periodo la caratteristica di determinare il fenomeno di estinzione di Schultz e Charlton negli scarlattinosi.

Non credo che l'osservazione del prof. Stazzi (*che nel sangue di cavallo e di coniglio trovasi comunemente lo streptococco*) abbia un valore attendibile; sono d'accordo soltanto sul valore eccezionale di essa. Ammessa l'affermazione del prof. Stazzi come giustamente ha fatto osservare il prof. Azzi, sarebbe impossibile poter preparare terreni colturali al sangue che trovano invece un largo uso in laboratorio senza che l'evenienza cui accenna lo Stazzi abbia ad essere constatata.

Al prof. Zironi che desidera avere notizie più specificate sulla tecnica da me usata per la filtrazione del materiale scarlattinoso, dirò brevemente che raccoglievo dal malato in pieno esantema il muco orale in capsula sterile di Petri

assicurandomi che al malato stesso in questo periodo non venissero somministrate delle soluzioni disinfettanti per gargarismi. Stemperavo e diluivo tale materiale in soluzione fisiologica sterile, in modo da avere una sospensione omogenea per lo più molto densa a cui aggiungevo bacterium prodigiosum. La filtrazione della miscela così preparata avveniva lentamente (una goccia ogni mezzo minuto primo e poi una goccia al minuto ed anche meno).

Il materiale filtrato veniva insemenzato in terreni colturali sia liquidi che solidi. L'esperimento è stato eseguito 26 volte, con risultato positivo in 8. In queste 8 filtrazioni mi sono servito 4 volte della candela Berkefeld V, 2 della Berkefeld W, 2 della Berkefeld N.

Io faccio una sospensione più o meno densa non adoperando una sospensione tipo assoluta. Dunque lasciavo il filtrato nella bevuta per diversi giorni e poi lo prelevavo a temperatura ambiente con pipetta sterile e lo insemenzavo in terreno di agar sangue in anaerobiosi ed aerobiosi, mettendo il bacterium prodigiosus e chiudendo la piastra con plastirina e ho ottenuto qualche volta, perchè non si ottiene sempre, lo streptococco. Ripeto non tutte le volte dal filtrato del muco orale ottenevo lo streptococco; l'ho constatato qualche volta, per esempio otto volte positivo su 26.

Prof. Muggia. – Alla mia relazione non sono state fatte obbiezioni e quindi potrei anche esimermi dal prendere la parola: sono ben lieto di constatare quanto largo interesse e quale animata discussione abbia suscitato. Per me ha già risposto in parte il prof. Azzi, sopratutto alle obbiezioni fatte dal Prof. Favilli e dal prof. Stazzi sulla filtrabilità e sulla possibilità di trovare facilmente nei conigli lo streptococco. Ora, come ha già detto il prof. Azzi, nel nostro laboratorio, come in tutti i laboratori, vengono fatte correntemente emocolture, e preparati terreni culturali con agar e sangue che si leva dal cuore del coniglio, ma ben difficilmente, o raramente si osserva sviluppo di streptococchi durante il periodo di permanenza in termostato per la prova della sterilità.

Presidente. – Ringrazio nuovamente il relatore prof. Muggia per la sua importante relazione e prego il prof. Casagrandi di fare egli stesso la comunicazione sul

Micrococcus cinnabareus (*Flügge*)

che doveva essere fatta dalla prof.ssa Casagrandi.

L'A. riferisce su alcune ricerche eseguite sopra un cocco isolato molti anni or sono (1915) da una alga ricavata da un canale di una grande salina. Le colture erano rimaste in collezione chiuse alla lampada fino al 1927 nel quale anno furono eseguiti nuovi passaggi. I quali riprodussero senz'altro il germe primitivo che perciò era rimasto vivente nelle condizioni suaccennate per dodici anni.

Le caratteristiche del germe si mantenevano quelle stesse che rispondevano alla descrizione datane dal Flügge.

Studiandone la morfologia e la biologia unicamente allo scopo di vedere quali rapporti esso potesse avere con altre forme che erano state successivamente descritte appartenenti al gruppo dei micrococchi rosei, l'A. trovò che esso presentava delle caratteristiche ben nette che lo differenziavano abbastanza bene da quelli coi quali eventualmente avrebbe potuto avere rapporti.

È interessante notare come sperimentato negli animali e negli insetti mentre si dimostrava innocuo per cavie conigli e ratti, svolgeva azione patogena per i grilli, i nottuini e i maggiolini. Sotto il punto di vista della patogenicità verso gli insetti, l'A. ha anche fatto delle ricerche nel campo immunitario dimostranti specialmente, nei riguardi dei maggiolini, la possibilità di una vera immunizzazione.

Prendendo in esame le osservazioni fatte da Clerch e Sartory sul loro Micrococco cinnabareo, dalle quali risultava la possibilità della formazione nel velo di colture liquide, di forme bacillari e di filamenti, ha studiato la morfologia del germe in diverse condizioni di coltivabilità e ha potuto assodare che in alcuni veli realmente le forme ovoidi possono essere punto di partenza di raggere di corti o lunghi filamenti i quali però non si riproducono. Gli isolamenti monocellulari dei cocchi e dei filamenti riconducono costantemente alla forma coccica. Non crede però di potersi pronunziare sulla natura di questi filamenti: ad ogni modo ritiene di trovarsi in presenza di un germe coltivabile che presenta delle nette parentele con delle alghe microscopiche.

Ma non è tutto perchè esaminando i tubi di coltura nei quali il germe era rimasto indisturbato per 12 anni con grande meraviglia ebbe a constatare che non era possibile rinvenirvi alcuna forma nè coccica, nè filamentosa. Le patine sui becchi di clarino ancora di aspetto cerico, erano costituite da una massa o glia amorfa che pur tuttavia era capace di dar luogo a patine rigogliose di cocchi ben formati nei nuovi passaggi.

Sottoponendo a diluizione questa glia con acqua distillata, il filtrato riproduceva ancora colture di cocchi; (la filtrazione era eseguita attraverso Berkefeld W.).

Per quanto le ricerche che ha potuto eseguire si siano dovute fermare a questo punto per ragioni indipendenti dalla propria volontà, l'A. ritiene tuttavia che siano sufficienti per condurre alla con-

clusione che si tratti di un germe che presenta delle caratteristiche molto importanti per gli studiosi, in quanto che mentre esso va ascritto con tutta probabilità al gruppo delle alghe, può forse costituire il mezzo per accertare l'esistenza di altre fasi di vita in esseri che siamo abituati a considerare esistenti e dimostrabili soltanto in quella forma che si può osservare ed individuare al microscopio.

Discussione.

Prof. Domenico Carbone. – Un fatto molto interessante nei riguardi di questo microrganismo è che è patogeno ad un tempo per gli animali inferiori e per una pianta, un'alga. Vorrei sapere dal prof. Casagrandi qualche notizia più precisa sopra le prove di vaccinazione degli insetti che sono state fatte da lui, e cioè se sono state fatte su insetti perfetti o su larve e per quali vie, ed anche, in modo speciale, se ha tentato la via orale. Siccome alcuni studi che abbiamo in corso fanno, non potendosi precisar nulla, almeno pensare che la via orale possa essere un veicolo di vaccinazione degli insetti sarebbe interessante conoscere se il prof. Casagrandi ha tentato la via orale. Vorrei poi anche sapere se si sono fatte, o se comunque sono possibili a farsi per la più o meno facile coltivabilità delle alghe, anche delle prove di vaccinazione dell'alga contro questo microrganismo, perchè un microrganismo il quale attacca contemporaneamente e i vegetali e gli animali mi pare si dovrebbe molto bene prestare a quell'indirizzo di studi che riguarda specialmente la possibile parentela delle forme di immunità tra animali inferiori e piante, le possibilità di immunizzazione degli animali inferiori e delle piante inoculate, e la possibilità di immunizzazione attiva delle piante.

Prof. Casagrandi. – Prove di patogenicità del germe sulle alghe non sono state eseguite, perchè in sulle prime, dopo che fu isolato, fu considerato come un germe comune. Si sapeva che si trovava nell'aria di varie città, come per esempio in quella di Wurzburg: del resto queste alghe non erano a nostra disposizione, perchè ormai, nel 1915, ci eravamo trasportati dalla Sardegna a Padova. Riguardo alle prove di infezione degli insetti per via orale esse sono state eseguite per questa via in modo indiretto, perchè si sono insemenzati quei terreni al disotto dei quali noi sapevamo che c'erano le larve di maggiolino.

Le prove di immunizzazione sono state eseguite sugli insetti perfetti, passando leggermente sotto superficie cutanea, al disotto delle ali, un finissimo ago tirato alla lampada, uno di quegli aghi di cui mi sono servito nelle ricerche sotto al campo del microscopio manipolatore. Si è del resto seguita la tecnica di questi studiosi francesi che, come Palliot, hanno eseguito esperienze del genere anche perchè l'avevano già adottata per altre ricerche e precisamente per i bachi (me ne ero occupato molto a proposito del bacillo della tubercolosi) usando un ago molto sottile senza stringere molto l'animale, si riesce a non danneggiarlo. Certo, che la traumatizzazione qualche volta dà

anche la morte, ed è ugualmente accertato che ci vuole manualità prima di giungere ad ottenere che gli insetti che si sperimentano non risentano troppo dei traumatismi che su loro si esercitano. Studi dettagliati sono stati poi fatti per stabilire la quantità del materiale da inoculare: noi calcoliamoche in ogni gocciolina non ci debbano esser più di un centinaio di germi. Essi sono sufficienti a provocare l'immunità dell'insetto. Difatti se si ritorna a fare l'inoculazione, per esempio dopo 8-10 giorni l'animale non se ne risente, mentre nelle condizioni ordinarie muoiono. La seconda iniezione negli insetti, si può fare con maggior numero di germi e anche superare il migliaio con la quasi sicurezza che l'animale non muore.

Il *Presidente* prega il Dott. G. C. Torri di svolgere la sua comunicazione:

Sulla permanenza degli anticorpi eterogenei negli animali normali ed anafilatizzati.

Dott. G. C. Torri: Pochissimi autori, a quanto ho potuto rilevare dalla letteratura, hanno finora trattato l'argomento affidatomi da svolgere nei laboratori di questo Istituto dal Prof. Zironi: cioè, se gli anticorpi introdotti in un animale anafilatizzato verso la proteina alla quale questi anticorpi sono legati, vengano eliminati nello stesso periodo di tempo che negli animali normali.

La tecnica impiegata da questi AA. era la seguente, salvo piccole diversità: sensibilizzazione degli animali verso una proteina eterogenea (siero di cavallo, di cane, di coniglio, ecc.): inoculazione sottocutanea, endoperitoneale, endovenosa di quantità piuttosto forti del medesimo siero, contenente anticorpi facilmente dimostrabili (antitossina difterica, agglutinine) inoculazione che produceva uno shoc negli animali anafilatizzati: ricerca, con salassi a periodi di tempo successivi, degli anticorpi circolanti.

Dörr e Pirk trovarono che gli animali normali e gli animali anafilatizzati si comportavano ugualmente quando il salasso era fatto a breve distanza di tempo dall'iniezione contenente gli anticorpi, mentre già dopo 24 ore gli animali anafilatizzati avevano sensibilmente diminuito il contenuto degli anticorpi nel sangue circolante rispetto ai normali. Questa diminuzione si faceva, fino ad un certo limite, sempre più spiccata, finchè avveniva la completa scomparsa degli anticorpi del circolo, mentre erano ancora presenti negli animali normali.

Hilda Hempl, sotto la direzione del Prof. Madsen di Copenaghen, inoculando endocardialmente il siero contenente gli anticorpi,

produceva uno shoc: già pochi minuti dopo di esso, notava diminuzione di anticorpi nel circolo degli animali anafilatizzati.

Römer e Vierck, salassando gli animali normali e anafilatizzati 15 minuti, 60 minuti, 4 ore dopo l'iniezione intracardiaca di siero contenente anticorpi, trovavano diminuzione di questi nel sangue degli animali anafilatizzati.

Livierato e Vagliano notarono la scomparsa degli anticorpi anche poche ore dopo l'iniezione endoperitoneale di forti quantità di siero altamente agglutinante.

Da nessuno degli AA. sopracitati è stato ricercato come reagissero gli animali normali ed in istato di anafilassi preventivamente sieroterapizzati, all'inoculazione di tossina a distanza variabile dalla iniezione protettiva.

Volendo risolvere questo problema mi era necessario ricercare per quanto tempo una cavia anafilatizzata restava protetta verso una tossina da anticorpi di questa tossina veicolati dal medesimo siero che aveva servito da antigene nella sensibilizzazione dell'animale — e come si comportava invece una cavia normale sottoposta ad un medesimo trattamento. Inoltre volevo stabilire quale importanza potesse avere la via di somministrazione dell'antitossina.

Impostai l'esperienza nella seguente maniera: un gruppo di animali anafilatizzati verso siero normale di cavallo ricevevano una unità antitossica antidifterica in siero di cavallo. Impiegai un siero a 1000-1200 unità antitossiche per cc. diluendolo in soluzione fisiologica in modo adatto per ottenere in ogni cc. di soluzione una unità antitossica, che inoculavo per via endovenosa o per via sottocutanea in cavie di circa 250-300 gr. di peso. A questi animali così protetti inoculavo, ad intervalli diversi di tempo, due dosi minime letali di tossina difterica per via ipodermica.

Un ugual numero di cavie normali circa del medesimo peso subivano lo stesso trattamento per controllo.

Ho scelto la inoculazione di piccolissime quantità di antitossina, perchè molto più facilmente avrei potuto segnalare la scomparsa della protezione che non ricorrendo a dosi più alte.

Ho impiegato una tossina difterica secca e stabilizzata, diluendola in modo d'avere due dosi minime letali per ogni cc. di soluzione fisiologica.

Ho avuto cura di inoculare l'antitossina in una regione lontana da quella dove avevo inoculato il siero normale per anafilatizzare

gli animali e la tossina in una regione lontana da quella dove avevo praticato le due prime iniezioni.

Feci parecchie serie di esperienze, variando il tempo di intervallo tra l'iniezione di antitossina e quella di tossina: 12, 24, 36, 48, 72 ore 120 ore cioè 5 giorni 192 ore cioè 8 giorni.

Da queste esperienze ho potuto rilevare che la via di introduzione dell'antitossina non ha importanza circa la protezione conferita. Infatti tanto gli animali anafilatizzati come i normali presentarono gli stessi fenomeni alla inoculazione di tossina, tanto se il siero antitossico era stato inoculato per via endovenosa, come per via ipodermica.

Gli animali normali e quelli anafilatizzati, curati preventivamente, si comportarono in modo diverso riguardo la gravità delle lesioni locali indotte dall'iniezione di tossina. Queste lesioni furono in generale più vaste e guarirono di regola più lentamente nelle cavie anafilatizzate che non in quelle normali.

Ad intervalli relativamente brevi di tempo (fino a 72 ore) tra iniezioni di antitossina e di tossina, la differenza di reazione tra animali normali e anafilatizzati non fu molto spiccata, pur essendoci manifestamente minor protezione negli animali anafilatizzati.

A 120 ore, invece, cioè dopo 5 giorni, l'animale anafilatizzato ha molto ridotto le sue difese in confronto del normale, reagendo molto più intensamente alla tossina, sia presentando formazione escarotica più vasta, sia deperendo più fortemente.

A 192 ore d'intervallo, cioè dopo 8 giorni, gli animali anafilatizzati soccombono in meno di 24 ore coi sintomi di intossicazione acuta difterica, mentre i normali soccombono anche essi, ma in istato cachettico e dopo un periodo di tempo più lungo che nelle mie ricerche variò nei vari animali da 5 a 14 giorni dall'iniezione tossinica.

Dopo d'aver stabilito il periodo di protezione conferito agli animali normali ed anafilatizzati da una iniezione di antitossina difterica, ricercai come si comportava il contenuto di anticorpi nel sangue circolante degli animali delle due serie.

Questa seconda serie di ricerche mi sembrava assai interessante rapportare ai risultati ottenuti colle esperienze precedenti.

Per la ricerca degli anticorpi antidifterici circolanti impiegai il metodo di Römer e Sames con la tecnica descritta dal Kolmer.

Inoculai una unità antitossica di siero antidifterico di cavallo in cavie sensibilizzate verso siero di cavallo ed in cavie normali del medesimo peso. Ad intervallo di due giorni e di 5 giorni da questa

iniezione, salassai dal cuore le cavie delle due serie, e, sul siero ottenuto con cetrifugazione, ricercai gli anticorpi.

Già dopo due giorni dall'iniezione di antitossina, le cavie anafilatizzate presentavano una notevolissima diminuzione degli anticorpi circolanti in confronto agli animali normali.

Al 5° giorno gli anticorpi circolanti nel sangue degli animali anafilatizzati erano del tutto scomparsi, mentre incominciavano appena a diminuire nei normali.

Queste osservazioni complessivamente confermano quanto già era noto: però nelle condizioni sperimentali da me usate, la scomparsa degli anticorpi non fu così rapida come nelle esperienze precedenti, perchè gli anticorpi furono dimostrabili indirettamente per circa 5 giorni, se dobbiamo attribuire il salvarsi delle cavie inoculate con ben due dosi minime letali di tossina alla persistenza negli animali di piccole quantità di anticorpi.

Viceversa essi non poterono venir dimostrati nel sangue circolante in prove dirette già dopo 48 ore.

Questi esperimenti tenderebbero a provare quanto già Dörr supponeva: che cioè la scomparsa dal circolo di anticorpi non potesse significare assolutamente la loro eliminazione dall'organismo degli animali anafilatizzati, in quanto si può pensare che gli anticorpi scomparsi dal circolo possono essere rimasti fissati nei tessuti e nelle cellule.

Il fatto troverebbe analogia anche con quanto Dörr pensa avvenga nell'anafilassi passiva, nella quale il periodo di incubazione dipenderebbe dal tempo necessario alla fissazione degli anticorpi iniettati alle cellule dell'ospite.

La eliminazione degli anticorpi legati alle cellule sarebbe più lenta di quella degli anticorpi liberi negli umori.

Il *Presidente* prega il Dott. F. Cantani di svolgere la sua comunicazione:

Un quadriennio di esperienze sulla Vaccinoterapia locale.

Dott. F. Cantani: Lo studio della difesa locale dell'organismo all'azione di quei virus elettivi che, come il Sanarelli ha tra i primi dimostrato, sono forniti di tropismo positivo verso determinati organi o tessuti, per merito precipuo di Besredka, è andato assumendo attraverso migliaia di sperimentatori, importanza sempre più grande

specialmente per quanto è in rapporto con le innumerevoli applicazioni dell'immunizzazione locale nell'uomo.

Fin dal 1926, prendendo in esame qualcuno dei tanti punti oscuri delle teorie emesse sulla immunizzazione dell'organismo in toto ed esaminando i numerosi insuccessi dei vaccini contro quelle infezioni che non si lasciano affatto influenzare da un rinforzo o da un aumento degli anticorpi nel sangue per insufficienza di reazione difensiva o per mancanza di arrivo delle difese ai focolai colpiti, secondo Wright, ricordai come, secondo la concezione di Besredka, gli organi ed i tessuti sedi abituali delle infezioni rappresentassero anche i migliori apparecchi immunizzatori contro quei germi che dimostrano positivo e specifico tropismo verso di essi e conclusi che per tutte le infezioni localizzate si palesa assai più razionale mettere in diretto contatto l'organo od il tessuto recettivo anzichè tentare di provocare una incostante e spesso inefficace elaborazione di anticorpi da parte dell'organismo in toto.

Dopo il controllo di una lunga serie di esperimenti sull'uomo eseguiti sia a mezzo dei filtrati di brodoculture secondo la tecnica originale di Besredka, sia a mezzo di sospensioni batteriche in mezzo isotonico attenuate al calore, dei loro filtrati, di agarvaccini fusi a vapore fluente, di lipovaccini eseguiti secondo le tecniche che ho già avuto occasione di illustrare, tenendo conto non solo del risultato dei tentativi terapeutici ma anche ed in ispecial modo con lo studio delle singole reazioni locali e generali, nonchè con lo studio delle tendenze alle recidive, espressi l'opinione che l'immunità locale non dovesse essere soltanto intesa come il risultato della antivirusterapia ma dovesse essere considerato come « uno stato di refrattarietà acquisibile con mezzi varii da un dato organo o tessuto dell'organismo elettivamente e specificamente contro quel virus determinato a tropismo positivo specifico per ciascuno di essi ».

Ricorderò di sfuggita come Eisler e Lehndorff dell'Istituto Sieroterapico di Vienna si sono serviti di un « antivirus modificato » che avrebbe molti punti di contatto con le tecniche già prima da noi illustrate.

Nel 1928 ripresi, in collaborazione con Scala, lo studio del meccanismo di azione per cui un determinato organo o tessuto passa dallo stato d'infezione a quello d'immunizzazione contro l'infezione stessa e, dopo una complessa serie di ricerche e di esperienze, venimmo alle seguenti conclusioni:

a) L'immunità locale non è che il risultato dell'azione immu-

nizzante strettamente specifica svolta a carico del tessuto preda dell'infezione dalle anatossine che esplicano netto potere antitossico quali prodotti antigenici, dai corpi batterici stessi più o meno marcatamente modificati, da una serie complessa e non esattamente definibile di prodotti che partono dal batterio stesso per giungere fino agli ultimi suoi prodotti di disintegrazione.

b) Agli ultimi prodotti di scissione batterica considerati aspecificamente, come ai disintegrati proteici dei terreni di cultura, come a moltissime sostanze eterogenee che chimicamente a questi ed a quelle si avvicinano, non può essere attribuita la qualifica di mezzi immunizzanti poichè i fenomeni pseudoimmunitarii di cui essi possono essere provocatori sono talmente scarsi e di lieve entità da non meritare di esser presi in considerazione.

c) Nella produzione della I. L. anche l'organismo in via di immunizzazione riveste una parte non trascurabile con meccanismo non bene chiarito; dobbiamo ammettere che anche per il tessuto considerato isolatamente esistano stati di allergia e di anergia rispetto all'azione dei germi infettanti e dei vaccini locali.

d) Le nostre ricerche menano ad una concezione che si asside arbitra tra i due gruppi di ricercatori e cioè tra coloro che col Besredka sostengono la specificità della I. L. e quelli che la stimano una immunità aspecifica: i nostri esperimenti infatti confermano pienamente la allergia essere in rapporto al germe e non alle proteine dei mezzi di cultura come pure ci portano ad ammettere che deve essere negata, quale prodotto di una attività vitale del germe, la secrezione di una sostanza biologicamente sua antagonista, quindi che, secondo le nostre ricerche, non sarebbe da identificarsi nè con l'antivirus di Besredka, nè con prodotti di disintegrazione dei terreni nutritivi essendo rappresentato dalle proteine, anatossine, del germe stesso.

e) Dobbiamo ammettere come giusta la concezione del Besredka sul meccanismo della I. L. sostituendo ad una entità non dimostrabile, l'antivirus, una entità meno astratta: il germe o i costituenti del suo deutoplasma a funzione antigene e vaccinica.

Nell'ambito di una breve comunicazione non mi è consentito riportare dettagliatamente i dati della mia statistica che verte su un numero complessivo di 612 casi la maggior parte dei quali con infe-

zioni localizzate dei tegumenti cutanei ma non posso non richiamare l'attenzione sul fattore della termostabilità batterica in rapporto alle capacità antigeniche e particolarmente nei riguardi delle sospensioni di bacilli del carbonchio che non hanno perdute le loro spiccate qualità immunizzanti dopo esser state sottoposte per 20 minuti a due atmosfere di pressione sì che in due casi di carbonchio cutaneo nell'uomo mi fu possibile documentare l'efficacia dell'istituito trattamento autovaccinoterapico locale. Nella totalità dei casi nei quali mi è stato possibile eseguire esami batteriologici, microscopici e culturali in serie ho costantemente rilevato come il numero dei germi esistenti a livello della lesione tenda costantemente, dopo la prima applicazione, ad aumentare in modo notevolissimo per poi decrescere più o meno rapidamente ma sempre in modo assai spiccato dopo le successive applicazioni: tanto più marcata è tale differenza quantitativa tanto più netta e decisa è la miglioria della lesione.

Ricorderò infine che mi è riuscito possibile dimostrare capacità immunizzanti anche ai filtrati di sospensione batterica sottoposta all'azione del calore.

Dalla serie delle mie esperienze sull'uomo in casi di foruncoli, ascessi, paterecci, flemmoni, antrace, sinoviti, piaghe infette, sicosi parassitarie, otiti, piodermiti, pustole maligne, infezioni puerperali, disfacimenti purulenti di uteri cancerigni, ecc., non ho avuto che da lodarmi della terapia biologica locale ed, in gran numero di casi, specie per quanto riguarda la tendenza alle recidive e lo stabilirsi di stati d'immunità più duraturi, ho potuto dimostrare la superiorità di azione delle sospensioni batteriche rispetto ai brodofiltrati di Besredka. Di fronte ai successi ora rapidamente elencati soltanto di rado, come in un caso di foruncolosi localizzata in cui sorse un pseudo shock anafilattico, ho notate reazioni vivaci da attribuirsi con ogni probabilità a disfunzioni nervose od endocrine del soggetto più che all'azione diretta del vaccino, per cui la terapia istituita dovette essere abbandonata; anche in alcuni tentativi d'immunizzazione col gonococco di Neisser i risultati furorno del tutto insufficienti come del pari in casi di cistite, specie se da b. coli, la terapia biologica locale non risultò efficiente e provocò reazioni abnormi seguite da aggravamento del processo stesso.

Il *Presidente* prega il Prof. A. Cantani di svolgere la sua comunicazione:

Sui risultati dell'Associazione della Proteinoterapia aspecifica con quella specifica con preparazione di speciali vaccini.

Prof. A. Cantani: Le ricerche di cui imprendo a riferire non hanno bisogno di essere suffragate da un'ampia discussione preventiva perchè i relativi problemi che ad esse si riferiscono con gli studi profondi e numerosi eseguiti in questo ultimo cinquantennio, se non ancora ben chiarificati al riguardo dal meccanismo di azione da parte della proteinoterapia aspecifica, sono poggiati su solide basi per ciò che riguarda gli effetti pratici che da essa si ottengono.

Non è quindi necessario elencare il ricco ed esteso materiale bibliografico che esiste sull'argomento. Ritengo però doveroso citare semplicemente i nomi dei creatori fondamentali e degli assertori di queste diverse applicazioni vaccinoterapiche per far rilevare come, pur esistendo in questo ramo ricerche classiche da parte di autori stranieri quali R. Pfeiffer, Weichardt, Gehnidt, Vidal e altri, debbono essere messi in rilievo i nomi degli autori italiani, citando come un percursore il Cantani per le sue proposte di batterioterapia, e per il primo accenno alle endotossine batteriche, da lui fatte in proposito dei vibrioni del colera, e fra i fondatori e i creatori di nuove teorie al riguardo il Centanni, il Belfanti e la sua scuola, il Bruschettini, ecc.

Ma, fermandomi soltanto sul tema propostomi quello cioè della utilità dell'associazione a scopo immunizzante e terapeutico della proteinoterapia specifica associata con quella aspecifica debbo anzitutto far notare che, non potendosi, come vorrebbero alcuni autori, attribuire esclusivamente alla azione proteinica aspecifica l'effetto specifico dei vaccini batterici, le constatazioni fatte dall'azione benefica da parte delle proteine aspecifiche, comprese quelle batteriche, non solo ma anche di svariate altre sostanze come i metalli colloidali, anzichè distruggere, rafforzano in modo non dubbio la concezione dell'azione specifica dei batteri perchè, ammesso il concetto ribadito per primo da R. Pfeiffer dell'aumento di resistenza non specifica da parte delle proteine sembra più che opportuno asso-

ciare questo fattore a quello dell'immunizzazione specifica potendosi da questa concomitanza di azione avere migliori risultati anzichè con l'impiego esclusivo dell'uno e dell'altro coefficiente preventivo e terapeutico. Non è qui il luogo di entrare nella discussione dei meccanismi di azione di questi due sistemi tendenti ad aumentare le forze di difesa dell'organismo animale. A me basta pel mio tema di citare solo come base delle mie ricerche alcune constatazioni già fatte da altri autori dalle quali risulta anzitutto che pur non essendo possibile in organismi sani provocare aspecificamente la produzione di anticorpi specifici, mentre ciò avviene negli organismi ammalati cioè già sensibilizzati, non si può negare che anche negli organismi indenni l'aumento delle forze di difesa che si può ottenere aspecificamente possa contribuire ad impedire l'attecchimento in essi di agenti infettivi.

Costretti perciò come siamo dall'evidenza dei fatti a dovere nettamente distinguere l'azione proteinica non specifica da quella specifica, pur non dividendo l'opinione di coloro che vorrebbero, se non completamente almeno in parte, confondere che l'aumento di resistenza che si ottiene dalla proteinoterapia non specifica non deve per nulla essere disprezzato potendosi con esso ottenere risultati delle volte anche brillanti per la provocazione e la cura delle malattie infettive.

Da quanto ho dianzi accennato appare dunque giustificato il sistema dell'associazione dei due sistemi terapeutici. Di questa stessa opinione sono anche autori stranieri come Weichardt, Landsteiner, Doerr e Sachs che constatarono l'aumento di anticorpi specifici quando si rafforza l'introduzione parenterale di antigeni non attivi, come ad es., i lipoidi, con l'associazione proteica. Di questa istessa opinione è il Centanni creatore di nuove teorie immunitarie. Non è il caso qui di menzionare le disparità di vedute dei diversi autori circa il meccanismo di azione dell'una e dell'altra immunità da cui scaturiscono le diverse denominazioni adottate al riguardo come ad es., l'attivazione del protoplasma, l'azione catalitica, quella colloidale e così via dicendo. Ritengo soltanto necessario da una parte mettere in evidenza con i dati di fatto da me qui esposti la fondatezza e la logicità delle mie ricerche dalle quali potrebbe venire rafforzata l'opportunità di applicazioni pratiche dei due sistemi, dall'altra la possibilità di ottenere risultati più efficaci dalla partecipazione diretta dell'azione microbica specifica coltivandoli in liquidi

già affermatisi come di azione proteinica efficace o effettuando la preparazione di vaccini specifici servendosi direttamente di organi in cui questi microbi si sviluppano rigogliosamente durante la malattia dell'animale da esperimento, studiando così l'azione delle proteine specifiche e dei loro derivati provenienti sia da culture *in vitro* che da reperti patologici.

Non starò qui ad elencare i vantaggi che si potrebbero avere da un più rigoglioso sviluppa batterico in questi mezzi culturali e in questi organi infetti, oltre che dalla stimolazione prodotta sugli stessi microbi da queste proteine di diversa origine tenendo anche conto della maggiore attività fermentativa e disgregatrice da parte dei microbi e della maggiore virulenza con conseguente rafforzamento dell'azione vaccinica, fattori questi che dovrebbero venire alla loro volta intensificati dalla stimolazione prodotta sulle cellule sensibilizzate dell'organismo animale.

Ricerche personali.

Circa queste ricerche che da anni vado compiendo e che non si possono neppure dire del tutto espletate, sarà bene esporne i risultati classificandole ordinatamente.

Come punto di partenza e base di sostegno del tema impostomi debbo anzitutto citare alcuni esperimenti tendenti a confermare oltre che la maggiore produzione di anticorpi con la combinazione della proteinoterapia con la vaccinoterapia anche quella dell'azione delle diverse proteine ottenute da diversi organi normali mediante estratti idroglicerici, studiandone gli effetti circa la produzione delle agglutinine e degli anticorpi devianti il complemento.

Un'altra serie di esperimenti riguarda la possibilità di evitare o guarire una infezione mediante una proteinoterapia preventiva o consecutiva.

La terza e più vasta ricerca è stata quella di studiare l'effetto vaccinante di vaccini ottenuti da organi setticemici o da culture in latte contro alcune date infezioni.

L'ultimo gruppo di esperimenti infine riguarda l'azione terapica sull'uomo e il tentativo ben riuscito di rendere molto moderate o abolire addirittura mediante la iodizzazione le reazioni febbrili prodotte dalla proteinoterapia specifica.

AGGLUTININE E ANTICORPI DEVIANTI IL COMPLEMENTO IN SEGUITO A INIEZIONI DI ANTIGENO DI TIFO COMMISTO A PROTEINE DI DIVESA ORIGINE.

Le proteine sono state esperimentate sotto forma di emulsioni acquose idrogliceriche e degli organi di bue fenicate al 0,5 % tenute nell'apparecchio Frigo per quindici giorni. Dette emulsioni sono state praticate con poltiglie di cervello, di testicolo, di milza, di fegato e con latte sterilizzato. Il potere agglutinante e la deviazione nel complemento sono stati ricercati dopo ciascuna iniezione mista, di antigene e proteine, praticate le prime quattro dalla via sottocutanea e la 5ª da quella endovenosa, in confronto di due conigli di controllo inoculati solamente con antigeno, ricavato da una emulsione sterilizzata a 58° di cultura di tifo in agar usata nella diluizione di 5 culture di tifo in 6 cc. Le emulsioni proteiniche sono state iniettate nelle dosi di 1 cc. e di 1 1/2 cc.

I risultati di agglutinazioni positive sono state nei controlli nettamente inferiori che non negli animali così trattati con iniezioni miste perchè nei due conigli il limite massimo è pervenuto dopo la 4ª iniezione a 1 : 800, scendendo a 1 : 400 dopo la quinta, mentre nei conigli trattati con proteine si è raggiunto il limite massimo di 1 : 6400 in alcuni, di 1 : 3200 in altri; di 1 : 1800 in altri ancora. I peggiori risultati si sono avuti con la combinazione di estratto testicolare (limite massimo 1 : 800) i migliori con estratto di cervello (limite massimo 1 : 3200), con quelli di milza (1 : 3200) di latte (1 : 3200) ed i migliori di tutti con il fegato in cui l'agglutinazione ha raggiunto la quota di 1 : 6400.

Le deviazioni del complemento studiate con dosi differenti di siero non hanno fatto notare speciali differenze tra animali trattati con antigeni puri e quelli con antigeni misti, perchè mentre nel controllo si è avuto la deviazione positiva con un minimo di 0,05 di siero presso a poco gli stessi risultati si sono ottenuti con gli animali contemporaneamente proteinizzati.

In conclusione si può rilevare che le concomitanti iniezioni di proteine e di antigeni dànno dei risultati nettamente migliori in quanto ad agglutinine, quasi eguali per i corpi devianti il complemento. Per ciò che riguarda le diverse origini delle proteine bisogna pur rilevare che spetta alle emulsioni di cervello, di latte e di fegato, il principale merito superato in modo evidente da quelle di fegato.

Non bisogna però trascurare che pur avendo detti risultati una certa importanza devesi sempre considerare che essendo dette ricerche state praticate su animali diversi, le differenze notate possono attribuirsi anche alle differenti riserve di difesa organica esistenti nei diversi organismi.

Il valore differenziale tra le diverse origini proteiniche è perciò relativo, non così la conferma del maggiore tasso di agglutinazione ottenuto con le iniezioni miste.

Esperimenti riguardanti l'azione preventiva o curativa delle proteine nelle infezioni batteriche.

Meritano di essere qui riferiti alcuni esperimenti dimostranti come si possa per mezzo di iniezioni proteiniche provocare un aumento di resistenza non specifico da parte dell'organismo con possibilità di superare in questo modo la infezione.

Ad una serie di 12 conigli ho praticato preventivamente, contemporaneamente o consecutivamente delle iniezioni di 5 cc. di latte mettendo a prova la resistenza all'infezione mediante iniezioni di dosi piccole di carbonchio non fortemente virulento ma sicuramente mortali.

L'iniezione contemporanea, o consecutiva del carbonchio in dose di 0,05 cc. di brodocultura di 48 ore non riesce mortale se per 5 giorni si continua a praticare l'iniezione di latte. Se invece si prepara l'animale con 5 iniezioni giornaliere consecutive praticando l'iniezione di carbonchio il giorno seguente all'ultima iniezione e sospendendo il latte l'animale muore regolarmente dopo 48 ore.

Una sola iniezione contemporanea di latte e di carbonchio in regioni distanziate della cute non dà risultati positivi. Egualmente negativi risultano gli esperimenti con due iniezioni di latte l'una con 24 ore di precedenza e l'altra 24 ore dopo l'iniezione del carbonchio.

Questi esperimenti sono riusciti molto convincenti perchè ho potuto disporre in quell'epoca di un'adatta cultura di carbonchio non troppo virulenta. L'esperimento con le cinque iniezioni preventive di latte, sospendendo il trattamento il giorno seguente alla infettazione dell'animale, non riuscendo in contrapposto con gli altri a salvarne la vita, dimostra in modo inconfutabile la aspecificità del trattamento preventivo.

Vaccinazioni con culture proteiniche e con organi setticemici.

Non ci resta ora che elencare gli esperimenti di immunizzazione praticati sugli animali mediante cultura di batteri in terreni nutritivi contenenti proteine e con emulsioni di organi di animali morti per setticemia. Nell'un caso e nell'altro ho creduto anzichè iniettare contemporaneamente, come ho fatto pel carbonchio, proteine e batteri di servirmi di culture degli stessi batteri in liquidi proteinici o di emulsioni di organi setticemici. I vantaggi che si possono ottenere da questo sistema misto sono di svariata natura perchè sia con culture proteiniche che con organi infetti si ha il beneficio di potere iniettare proteine desintegrate dagli stessi batteri, quello di avere con siffatte culture microbi maggiormente incrementati nel loro sviluppo, nonchè con gli organi setticemici di potere disporre di microbi la di cui virulenza e attività è certamente superiore a quella di culture artificialmente ottenute con i soliti mezzi di cultura. Su di un altro vantaggio che è quello di potere più celeremente fabbricare un autovaccino dotato di più energica azione riferirò in ultimo, così pure sui risultati della vaccinoterapia mista sull'uomo.

Latticoltura.

Questi esperimenti sono stati istituiti soltanto col tifo e col bacillo melitense perchè solo con essi poteva ottenere delle culture in latte molto rigogliose senza che si producesse coagulazione. Altri esperimenti istituiti col gonococco sono ancora in corso. Le lattoculture dell'uno e dell'altro microrganismo sono state sempre di data non inferiore ai quindici giorni. Per ottenere culture abbastanza virulente dei due batteri mi sono servito di un metodo da me pel primo proposto in altre mie pubblicazioni, consistente nei passaggi al coniglio mediante inoculazione endocerebrale. Nelle cavie la dose mortale di tifo era di 1/50 di ansa normale dalla via sottocutanea e 1/100 da quella peritoneale, quella del melitense di 1/25. Mediante trattamento preventivo con 5 e con 6 iniezioni di lattovaccino tifico, gli animali hanno resistito ad iniezioni da 1/5 ad 1/10 di ansa di cultura tifica sia dalla via sottocutanea che da quella endoperitoneale e di 1/10 di ansa di cultura melitense.

La vaccinazione per bocca praticata solamente contro il tifo ha dato risultati meno brillanti perchè di otto cavie così preventivamente trattate solo cinque sono sopravvissute all'iniezione endoperitoneale di 1/20 e 1/50 di ansa normale. In un controllo una sola iniezione sottocute preventiva di latte normale non ha evitato la morte dell'animale consecutiva all'iniezione di 1/2 ansa di tifo.

Più difficili sono riuscite le esperienze sui conigli che pel tifo sono quasi refrattari. Per saggiare lo stato immunitario come ricorso alle iniezioni endocraniche mediante le quali la dose minima mortale si è rivelata in 1/1500 di ansa normale. Di cinque conigli preventivamente trattati con 16-19 iniezioni preventive di lattovaccino e con una iniezione endocranica consecutiva di 1/100 di ansa normale, uno solo è sopravvissuto, gli altri però sono morti dopo 12, 6, 4, 3 giorni mentre i controlli morivano in meno di 24 ore.

Le vaccinazioni preventive per bocca non hanno messo i conigli in grado di resistere tutti all'iniezione endocranica perchè di tre conigli così trattati ne è sopravvissuto solo uno. Bisogna pur considerare come si presti poco per il saggio dell'immunità l'iniezione endocranica che specie per il tifo riesce sommamente pericolosa e con grado di virulenza sempre aumentato da parte del bacillo iniettato.

Epatovaccini antitifosi.

Poichè l'inoculazione endocranica di tifo dà nel coniglio una intensa setticemia ho potuto facilmente sperimentare con vaccino ottenuti da emulsioni idrogliceriche di fegati di animali morti con setticemia ottenuta mediante iniezione endocranica.

In conigli trattati preventivamente con 13 iniezioni sottocutanee ed in uno con 19 somministrazioni per bocca l'iniezione endocranica di 1/100 e 1/150 di ansa normale di tifo è riuscita innocua.

Le cavie hanno dato un risultato egualmente brillante perchè trattate in numero di 14 con 1-7 iniezioni preventive di epatovaccino solo 2 sono soggiaciute all'iniezione di 1/2 - 1/5 di ansa normale mentre i controlli morivano con 1/100.

I controlli con fegato normale hanno dato risultato negativo con 1/2 ansa normale, positivo con 1/5.

L'epatovaccino per bocca ha dato buoni risultati nelle cavie che in numero di otto trattate giornalmente con miscugli di crusca ed epatovaccino per 7-14-30 giorni hanno resistito tutte tranne una all'iniezione di 1/2 - 1/5 di ansa di tifo.

Epatovaccini antipneumococcici.

I risultati di questi esperimenti sono anch'essi molto convincenti perchè in 10 conigli trattati preventivamente con 2 iniezioni di una emulsione di fegato setticemico si è ottenuto in tutti l'immunità verso l'iniezione sino a 2000 dosi mortali per kgr. (dose minima mortale 1/400000 per kgr. di brodocultura di 20 ore). In due conigli trattati con una sola iniezione preventiva di 2 cc. di epatovaccino si è ottenuto risultato negativo, mentre in altri due inoculati preventivamente con una sola iniezione di 5 cc. il risultato è stato perfetto.

La somministrazione per bocca in tre conigli per 13 giorni di seguito ha dato risultati negativi anche con sole 40 dosi mortali.

Cerebrovaccini.

Anche con il cervello di conigli inoculati dalla via endocranica emulsionato in soluzione fisiologica e sterilizzato si sono inoculati preventivamente due conigli sottocute uno con 10 e l'altro con 5 iniezioni preventive. Il primo animale è sopravvissuto all'inoculazione endocranica di 1/100 di ansa normale di tifo, il secondo è morto dopo 5 giorni mentre i controlli sono morti con le stesse dosi in meno di 24 ore e con 1/1000 in tre giorni.

La somministrazione preventiva per bocca di cerebrovaccino liquido ed essiccato non ha conferito ad un coniglio che una debole resistenza contro l'iniezione endocranica perchè è morto in 48 ore anzichè in 20 ore come i controlli. Ad un altro animale trattato con 33 somministrazioni orali preventive si è avuto dopo l'iniezione endocranica di 1/1500 di ansa la morte dopo 5 giorni.

Esperimenti vaccinoterapici.

Posso qui riferire in breve soltanto sugli esperimenti di vaccinoterapia antitifica e antimelitense praticati con lattovaccini riassumendo in brevi termini una comunicazione già fatta al Congresso ultimo di Patologia esotica. Debbo subito far rilevare come i risultati ottenuti con i lattovaccini sono stati veramente incoraggianti.

Le cifre statistiche sono le seguenti:

Di 38 casi di tifo si è avuta una pronta guarigione in 36, risultato negativo in due casi molto gravi. Di 12 casi di febbre melitense in tutti si è avuta la guarigione rapida.

Resta ora da discutere soltanto se questa vaccinoterapia proteinica da me sperimentata sia superiore a quella semplice, perchè nessuno può disconoscere che anche le iniezioni di latte giovano in questi casi; si potrebbe perciò opporre anzitutto l'obbiezione che niente dimostra la maggiore efficacia della vaccinoterapia proteinica. Ma io risponderò subito col far rilevare che si può concludere favorevolmente alla mia tesi per delle constatazioni da me fatte in alcuni dei miei ammalati di cui alcuni avevano già precedentemente praticata la proteinoterapia semplice senza risultato, altri la vaccinoterapia usuale con risultati egualmente negativi. La constatazione inoltre che il metodo da me usato è stato quello di cominciare con diluizioni notevoli fa metter piuttosto in evidenza l'azione vaccinica che quella proteinica per le prime iniezioni per le quali usavo 1 cc. di 1/100 - 1/50 - 1/25 lattocultura, quantità queste troppo piccole per dare una parte preponderante all'azione proteinica. E aggiungendo ancora che in quasi tutti i casi l'effetto si otteneva alla terza iniezione bisogna pur concludere che l'azione è duplice o meglio che si è sperimentato con una vaccinoterapia rinforzata. Nè si deve trascurare il coefficiente già messo in rilievo della maggiore azione da parte di culture ottenute in terreni nutritivi riccamente forniti di proteine sia per il più rigoglioso sviluppo dei batteri sia per una desintegrazione specifica da parte di queste culture con la formazione di prodotti tossici maggiori.

Ma qui è necessario metterci in guardia contro i deleteri effetti che questo supposto aumento di tossicità potrebbe procurare all'ammalato o per lo meno contro i troppo forti effetti reattivi che si possono avere da queste proteine desintegrate. Risponderò subito che ho già provveduto a ciò mediante la jodizzazione di questi vaccini il che è frutto di antiche mie esperienze istituite con la tubercolina ed in seguito con altre sostanze tossiche ricerche eseguite sul potere disintossicante ed antianafilattico del jodo, e già pubblicate. La jodizzazione come potetti anche dimostrare per la produzione di emolisine, non distrugge l'azione antigenica, evita soltanto le reazioni possibili febbrili.

Il certo si è che con questo mezzo si evitano le reazioni. Bisogna perciò aggiungere ai vaccini o preventivamente o all'atto della iniezione una soluzione glicerica di jodo al 2 % in diverse dosi.

Preparazione rapida di autovaccini.

Un vantaggio non trascurabile mi si sta delineando negli ultimi esperimenti che sto recentemente compiendo con l'innestare direttamente il sangue setticemico nel latte. Si possono così ottenere anche in 24 ore delle culture rigogliose di tifo e in tre giorni di melitense, il che facilita di molto la preparazione degli autovaccini.

Mediante l'inoculazione endocranica non riesce difficile nell'istesso modo di ottenere rapidamente una setticemia con possibilità di ricavare dal fegato o dal cervello setticemico rapidamente un energico autovaccino.

CONCLUSIONI.

In conclusione da questi esperimenti risulta in modo abbastanza evidente:

1° Che potendosi avere dalla combinazione della proteinoterapia aspecifica con quella specifica dei notevoli risultati in quanto ad aumento degli anticorpi o ad immunizzazione dell'ammalato può riuscire utile da parte della vaccinoterapia servirsi di questa doppia azione tendente l'una e l'altra con l'aumento della resistenza organica e con l'incrementazione della formazione degli anticorpi nell'organismo a render più efficace e più rapido l'effetto preventivo e terapeutico dei vaccini.

2° Che tra le proteine di diversa provenienza usate per questa azione cumulativa, possono dare ottimi risultati quelle del latte, e quelle della glandula epatica.

3° Che esse dimostrano una energica azione terapeutica certamente superiore a quella dei vaccini semplici perchè ottenute con culture insemenzate negli stessi liquidi proteinici o con organi setticemici ottenuti dagli animali infettati con l'iniezione endocranica.

4° Che permettono la sollecita preparazione di autovaccini sia mediante lattoculture che mediante organi setticemici.

5° Che con la jodizzazione pur evitando le forti reazioni proteiniche si può ottenere egualmente, sebbene con minore rapidità l'entrata dell'ammalato nello stato immunitario.

Il *Presidente* prega il Prof. Rigobello di svolgere le sue tre comunicazioni:

Comportamento dei sali ed acidi biliari nella lisi del pneumococco.

Prof. G. Rigobello: Da tempo il metodo di differenziamento colla bile dei pneumococchi dagli streptococchi ha portato come conseguenza allo studio ed all'uso isolato di taluni componenti della bile per ottenere analogamente l'azione specifica solvente verso i pneumococchi.

Il metodo corrente per differenziare è quello di Neufeld; vi è poi il metodo al taurocolato di sodio che può essere variato sostituendo ad es., il glicolato. Meno noti sono gli acidi grassi superiori non saturi che si trovano nella bile sotto forma di saponi, il potere solvente di questi prodotti lo si riscontra nel coleato sodico, nel chenocolato di sodio. Meno noti nell'esperienze varie sono gli acidi litocolico e desossicolalico. Ho scelto per appunto l'acido desossicolalico non citato nella letteratura trasformandolo nel sale corrispondente: all'uopo si scioglie l'acido in alcool assoluto alcalino per idrato sodico sino ad ottenere una debole reazione alcalina, il sale che si forma si lava in alcool ed etere e si ricupera per evaporazione. Con analogo processo ho trasformato in sapone sodico gli acidi oleico, linoleico, linoleinico.

I ceppi prescelti furono saggiati coi sieri di origine americana allo scopo di individuare il tipo; servì bene un ceppo fresco del tipo III ottenuto coll'inoculazione nel topino dello sputo di pneumonico, per mantenerne i caratteri fu usato il metodo di rivirulentazione attraverso il peritoneo di cavia secondo A. Monti. Fu necessario mantenere la virulenza perchè come ebbi occasione di riscontrare il passaggio attraverso vari terreni di cultura, come succede per l'ottochina fa aumentare la resistenza dei pneumococchi all'azione litica della bile. Così pure, dopo prove di orientamento, scartai i terreni liquidi glucosati perchè i pneumococchi divengono bile insolubili e perdono nel contempo la virulenza anche se si corregga il Ph. (acido).

1° Bile fresca. La bile è stata adoperata in quantità scalari da 0,1 sino ad un cmc. verso 1 cm. di brodo cultura. Essa appare nettamente solvente del pneumococco già alla dose di 0,2, nel con-

tempo i pneumococchi perdono la caratteristica di resistere al Gram ed utilizzando dei pneumo sospesi in soluzione di sangue del topino si nota che la capsula permane invece intatta.

2° La bile sterilizzata e filtrata è attiva a 0,1 ossia l'attività litica è più intensa che nella corrispondente fresca. Questa azione dipende indubbiamente dall'eliminazione delle mucine contenute nella bile ed alla maggior concentrazione dei sali biliari. Infatti la eliminazione delle mucine abbassa la tensione superficiale alla quale si deve imputare parte del meccanismo della lisi.

È noto infatti che mentre per tutti i germi l'abbassamento della tensione superficiale non determina fenomeni di lisi per il pneumococco invece è dimostrata una particolare labilità di fronte alla riduzione di essa. Questa riduzione della tensione superficiale della bile filtrata è dimostrabile per mezzo della reazione di Haj. La minor resistenza del pneumococco alla diminuzione della tensione superficiale fu dimostrata da Sarson ed altri col tensiometro di Lecompte de Nouy. Per contro il metodo della filtrazione porta un contributo atto ad escludere la possibilità che nella bile siano contenuti particolari fermenti litici che in tal caso verrebbero distrutti dall'azione della temperatura. Invece i pneumococchi trattati a 53 ossia alla temperatura di uccisione diventano bile insolubili e perciò come già aveva ricercato Avery si tratta di trasformazione della sostanza costituente il pneumococco probabilmente per inibizione o distruzione di fermenti proteolitici (triplolitici) del pneumococco per cui rimane inefficace in primo tempo l'abbassamento della tensione superficiale.

Per le prove coi sali ho seguito la metodica di scioglierli in acqua a varie concentrazioni e di addizionare un cmc. del soluto ad 1 cmc. di brodo cultura di pneumococco.

Taurocolato sodico. Il taurocolato sodico disciolto in modo da fornire le proporzioni da 1 : 20 sino a 1 : 160 determina una lisi spiccata che ad una cifra superiore ai 200 appare sempre meno evidente e cessa al titolo 1 : 320.

Glicolato sodico. Presenta un'azione fortemente litica sino ad 1 : 160, incostante ad 1 : 320.

Desossicolato sodico. Aggiungendo 1 cmc. di soluzione del sale al titolo 1 : 640 ad 1 cmc. di brodocultura dopo un'ora si constata che vi è una lisi ma molto marcata, il trapianto eseguito successivamente dà una cultura negativa.

Saponi sodici: (oleato, linoleato, linoleinato sodico).

Le ricerche sull'azione di questi saponi sono meno probativi di quelle ottenute da Richard con gli acidi grassi non saturi. Nelle brodoculture sono necessarie concentrazioni maggiori di sapone.

Pertanto il sale sodico dell'acido desossicolalico è quello che dimostra la maggiore attività solvente al titolo massimo 1: 640, analogamente agli altri componenti della bile determina la perdita della resistenza al gram mentre la capsula nel mestruo sangue brodo rimane conservata, si presenta come un energico riducente della tensione superficiale.

Il fenomeno che avviene nelle prove sperimentali in vitro potrebbe richiamare fondatamente un'analogia con quanto potrebbe verificarsi nel vivo durante il periodo risolutivo della polmonite. Infatti durante questo periodo nell'essudato furono notati da Clotz saponi in abbondanza verosimilmente questi saponi sono di provenienza dagli acidi grassi non saturi o dai loro saponi contenuti nei leucociti come lo attestano gli estratti di questi ultimi; il pneumococco durante questo periodo risolutivo appare lisato entro la capsula medesima pertanto nel meccanismo della risoluzione pneumonica fondamentale potrebbero intervenire i fattori sopra citati.

Discussione.

Dott. Foà A. – Mi permetto di dire qualche parola sopra questo fenomeno interessante della lisi del pneumococco. Io ho avuto occasione di occuparmi dell'argomento studiando se la lisi del pneumococco fosse in un certo rapporto con la presenza o meno nella bile di sali speciali, di diverso potere elettrolitico e diversa dissociazione ionica, e sono arrivato a questa conclusione; che il potere di solubilità dipende certamente dalla presenza nella bile di certi sali i quali favoriscono il fenomeno della lisi del pneumococco e specialmente i sali dei metalli così detti leggeri, quelli che hanno azione elettrolitica più spiccata, come i sali di sodio e di calcio. Il cloruro di stagno ha sempre favorito il fenomeno, ma a concentrazione minima. Minore efficacia hanno i sali di metalli pesanti (o bismuto e uranio), i quali molte volte inibivano il fenomeno della lisi. Ho provato anche l'azione di sostanze non elettrolitiche, le quali hanno dato risultati un po' discordanti. Il peptone, ad esempio, ha costantemente inibito l'azione solvente della bile; la gelatina ha dato risultati più costanti: in qualche raro caso a soluzione diluita ha favorito la lisi.

Prof. Rigobello. – Prendo nota di quello che ha detto: probabilmente vi è un meccanismo specifico dovuto alla bile ed uno aspecifico. Tutto ciò però rientra per la spiegazione nel campo chimico fisico ed in parte anche in quello

immunitario in senso lato. Infatti non basta per spiegare la lisi del pneumococco l'abbassamento della tensione superficiale e anche quindi l'intervento degli elettroliti ricordato dal collega, ma entrano anche in giuoco i rifornimenti proteolitici contenuti nel pneumococco. Infatti portando il pneumococco a 53 c. il germe non subisce più l'azione dei fermenti triptolitici che si liberano invece, coll'abbassamento della tensione superficiale nel pneumococco non trattato al calore, e diviene bile insolubile. Io ho omesso taluni dettagli perchè il tempo concesso alle comunicazioni è breve. Pertanto il fenomeno va considerato secondo tutti gli aspetti sopra accennati.

Il *Presidente* invita il Prof. Rigobello a svolgere la sua nota:

Sull'antagonismo fra il B. piocianeo ed il suo filtrato verso bacteri varii in vitro ed in vivo (1 Nota).

Prof. Rigobello: Al b. piocianico sono stati attribuiti da lungo tempo poteri antibiotici e di antagonismo verso un notevole numero di germi ed inoltre all'elemento piocianasi a sè o contenuto nel filtrato potere immunizzante.

In merito all'argomento vi sono talune ricerche risolte in senso probativo ed altre sulle quali vertono contraddizioni e che presentano lacune: sono risolte affermativamente le ricerche di Weinberg ed Asnar sull'azione nettamente favorevole del piocianico allo sviluppo dei seguenti anaerobi: Perfringens, vibrione settico, oedematiens, tetanico histoliticus, sporogenes fallax aerofetidus tertius putrificus, bifermentans, botulinus; così pure è nota l'azione litica da parte del b. e della piocianasi verso il bacillo difterico (Richard, Muhsam Saar, Hosoja) e parimenti verso il meningococco, micrococco catarrale, il B del tifo (Rumf), il vibrione del colera (Kitasato). La letteratura porta un largo contributo all'antagonismo del B piocianico verso il B anthracis in vitro ed in vivo, nonchè parimenti azione antagonista del filtrato (Charrin e Guignard), alla quale si aggiunge l'azione antibiotica in vivo del prodotto sterile di piocianico che renderebbe apatogeno il B carbonchioso (D'Agata, Fortineau).

Esaminando le osservazioni e le conclusioni degli AA. surriferiti come pure le conclusioni più recenti di Fabris si osserva che rimangono delle incertezze in merito al carattere di una netta capacità carbonchicida in rapporto all'età delle culture a quella dei filtrati, alla distinzione nei filtrati medesimi di prodotti ritenuti labili ed altri ritenuti stabili, così pure rimane incertezza generica dell'at-

tività della piocianasi in confronto ai veleni totali solubili delle colture e filtrati.

In merito all'antagonismo recentemente si è riparlato nello studio degli antivirus di antagonismo del piocianico verso stafilococchi e streptococchi.

Nell'esposto della presente nota i germi studiati nel loro comportamento rispetto all'antagonista B piocianico furono il B antracis, difterico, stafilococco aureo, lo stafilococco albo, lo streptococco piogenes, viridans salivarius; in pari tempo fu osservato il comportamento del piocianico verso il filtrato omologo già ascritto secondo le ricerche di Emmerich e Low agli enzimi specifici, secondo Besredka all'antivirus ed il fenomeno del Batteriofago secondo Hauduroj, Combiesco, Ashenova, Zoeller, Rigobello.

Modalità. — Per la tecnica furono fatte semine associate contemporanee o postume e controlli nei giorni successivi, oppure semine nel mestruo culturale del piocianico o del suo filtrato, diluizione per saggiare la prevalenza, filtrazioni per candele Chamberland ed ogni altra tecnica relativa alla portata delle esperienze. La piocianasi fu ottenuta col metodo vecchio di Emmerich e Low e col metodo più recente Hosoja. Per l'esperienza fu usato un ceppo selezionato attivo di piocianico.

Esperienze. — Stafilococco: si fa semina mista contemporanea di stafilococco aureo e B piocianico; dopo un giorno si nota un forte intorbidamento al conteggio in cellula Leboeuf, i germi si pareggiano, al secondo giorno la coltura si pigmenta e successivamente si forma un velo in superficie, al conteggio il numero dei componenti si equivale; al quinto giorno prevalenza numerica del piocianico, dopo 10 giorni eseguendo un trapianto si sviluppano nella stessa cultura ambedue i germi, l'andamento culturale misto prosegue in modo analogo alla prima cultura.

b) Semina contemporanea di stafilococco albo e piocianeo. Si nota analogo reperto dato dallo stafilococco aureo.

2° Azione del filtrato fresco del B. piocianico sullo stafilo albo ed aureo: l'aggiunta di 1 cmc. e di 2 cmc. alle colture in brodo non dà reperti, la semina diretta in filtrato rispettivamente dello stafilo, albo ed aureo permette uno sviluppo rigoglioso di entrambi le colture. *b*) Filtrato vecchio. La semina in filtrato vecchio di un mese determina uno sviluppo discreto seguito da lieve chiarificazione in

terza giornata, microscopicamente e culturalmente scompare al quinto giorno lo stafilo albo, permane invece lo stafilococco aureo che è trapiantabile in coltura pura.

Piocianasi. — L'azione della piocianasi contenuta nella quantità di 8 cmc. del materiale culturale estratta sotto forma di cristalli è meno attiva della corrispondente quantità di filtrato vecchio di un mese.

Streptococco. — *a*) Cultura contemporanea mista di streptococco piogenes, salivarius, viridans e piocianeo: si nota sviluppo di entrambi i germi; *b*) semina di piocianeo dopo 24 ore in una delle precedenti culture, appare prevalente il piocianeo al conteggio, riduzione delle forme a catena.

2° Nella semina nel filtrato fresco di piocianeo si nota lieve prevalenza numerica di questo, ma tutti gli strepto dopo 10 giorni sono ancora trapiantabili.

3° Semine in filtrato vecchio: il più sensibile è lo streptococco viridans, poi il salivarius, il più resistente è lo streptococco piogenes, i due ultimi germi dopo 10 giorni sono ancora trapiantabili.

Piocianasi. — L'azione sugli strepto adoperando il quantitativo (estratto) equivalente a quello contenuto disciolto nel filtrato appare meno marcata.

Bacillo difterico. — *a*) Le culture miste di B. difterico e piocianeo al terzo giorno fanno osservare una lisi completa. L'aggiunta di una ansata di B difterico ad una cultura di piocianeo dà parimenti una lisi, il B difterico al quarto giorno non è più trapiantabile. *b*) L'azione del filtrato fresco nel rapporto 1: 10 verso il B difterico dà un reperto di scarsa attività, la semina del B difterico nel filtrato di piocianico fa notare principio di lisi con forme tozze in ottava giornata; l'azione del filtrato vecchio di un mese al quantitativo di 1 cmc. inibisce parzialmente lo sviluppo; la semina nel filtrato totale di piocianeo di un'ansata di B difterico determina al quarto giorno la lisi totale. La piocianasi contenuta in 8 cmc. è meno attiva del filtrato totale.

Attività omologa del piocianeo. — Il filtrato fresco inibisce debolmente la pigmentazione se aggiunto nella quantità di 1 cmc. alla cultura di 24 ore del B; lo sviluppo nella semina in filtrato vecchio

avviene stentatamente, compaiono forme anomale rotonde, manca il velo, debole l'azione inibente della piocianasi.

B. antracis. — Il B piocianeo seminato nella cultura di carbonchio nell'età di tre giorni attecchisce ma nei trapianti misti successivi prevale il carbonchio e dopo 15 giorni si isola il carbonchio puro. La semina contemporanea dei due germi dà prevalenza al B piocianico che inibisce la spora. Il B del carbonchio seminato nel filtrato fresco di piocianeo rimane virulento, mentre dopo la permanenza di due mesi viene distrutto nè si hanno elementi per attestare presenza di spore. La piocianasi non si dimostra attiva sulle spore.

Concludendo appare dalla ricerca che vi è un comportamento differente e ben netto tra l'azione del filtrato totale contenente tutti i prodotti solubili e la piocianasi che rappresenta pertanto un elemento attivo parziale nell'azione antibiotica ed antagonista, questo comportamento complessivamente è stato notato per tutti i germi trovati in vitro, per contro il filtrato vecchio di piocianeo fa scomparire l'indizio della presenza di spore del carbonchio, si è avuta la conferma della pochissima resistenza del B difterico, fu osservata la scarsa resistenza dello stafilococco albo che viene distrutto, per contro lo stafilococco aureo e gli streptococchi si dimostrano resistenti.

Prove in vivo. — Esse sono ancora sub judice ed in via di esecuzione, tuttavia si può anticipare un giudizio rispetto al diverso comportamento sia nei rispetti del trattamento per via parenterale ovvero per applicazioni locali; così pure attestano che si deve tener conto nel trattamento dell'età del filtrato rispetto al contenuto in tossina ovvero ad un altro elemento non identificabile per ora all'antivirus del Besredka ma non confondibile con la piocianasi che esplica un'attività particolare propria.

Il prodotto fresco che contiene la tossina nell'applicazione locale agisce come uno stimolante del processo suppurativo favorendo talora l'azione secondaria dei piogeni in particolare secondo osservazioni compiute su due casi dell'uomo verso lo streptococco dell'eresipela; il filtrato fresco a dosi piccolissime frazionate non mortali iniettato invece ha il potere di rendere più resistente l'animale all'azione dei piogeni. Rispetto al potere antagonista del piocianeo verso il carbonchio l'iniezione contemporanea di cultura mista di piocianeo e carbonchio in confronto agli animali controllo iniettati

solamente di carbonchio determina fenomeni di minor virulenza piuttosto per il coniglio che per la cavia; si possono ottenere dei ceppi B carbonchioso attenuati verso il coniglio trattandoli nel mestruo di piocianeo. Queste esperienze verranno ulteriormente continuate anche su animali di più grossa taglia.

Il *Presidente* invita il Prof. Rigobello a svolgere la sua comunicazione:

Sull'ipersensibilità paradossa negli esantemi vaccinali.

Prof. Rigobello: La comparsa di esantemi vaccinali fu osservata da molto tempo (vedi ricerche originali di Von Pirquet e quelle di Belfanti e Battistini). Tali esantemi rientrano collo studio dell'anafilassi nel fenomeno paradosso del Behring.

Il sottoscritto ebbe occasione di seguire in tre lattanti vaccinati presso il Consultorio della Croce Rossa Italiana di Pavia, manifestazione del genere che tuttavia presentano come carattere particolare rispetto ad un medesimo lotto di vaccinati di essere comparsi solo in tre lattanti alimentati con latte vaccino mentre gli altri che non hanno sofferto disturbi erano alimentati con latte materno. La forma ha seguito l'evoluzione della pustola vaccinale, i primi accenni sotto forma di un piccolo rilievo papillare si presentarono verso il 6° giorno, successivamente si è formata una vescicola con lieve contenuto sieroso e poi grigiastro con tendenza ad essiccarsi al centro verso il 10° giorno e con accompagnamento di un notevole prurito durante tutto il decorso. L'eruzione presentava caratteri analoghi allo strofulo, e sebbene l'eruzione sia apparsa un po' più precocemente, per il modo di formarsi della papula e per i fenomeni successivi tende ad identificarsi colla forma sopradescritta. Nella mucosa boccale non furono notate manifestazioni a tipo di esantema, e in precedenza fu avvertita una macchia fugacissima seguita da un ponfo appena accennato che diede luogo all'insorgere di una papula con formazione di crosta ematica per grattamento. L'esame della formula diede durante l'esantema leucopenia temporanea, eosinofilia, qualche rialzo di temperatura, scarsa infiltrazione gangliare. Dallo studio comparato è noto che gli esantemi della prima vaccinazione compaiono con grande regolarità verso l'8°-12° giorno dopo l'innesto e presentano forme svariatissime consistenti essenzialmente in eruzioni polimorfe di orticaria con speciale

carattere follicolare, tal'altra volta invece vi è la possibilità che in soggetti a diatesi essudativa con particolare ipersensibilità quindi del tessuto cutaneo si abbia la forma di vaccinia generalizzata per diffusione per via ematogena, come pure vi possono essere complicanze da auto inoculazione per disseminazione da grattamento od altre cause meccaniche e infettanti.

Nel caso presente la forma invece era nettamente da ascriversi ad una insorgenza di strofulo che si accompagnava con esantema vaccinale. I soggetti in questione furono vaccinati adoperando pel trattamento vaccinale la linfa vaccinica dell'Istituto Vaccinogeno di Pavia presso l'Istituto di Patologia Generale. Questo vaccino è ottenuto per il secondo passaggio sulla mucca della semente che si ottiene sul vitello scarificato con materiale preso dal bambino vaccinato con la linfa (in altri termini la semente rappresenta il primo passaggio sul bovino di un virus umanizzato).

Furono già notate in passato delle forme reattive a tipo di esantema da ascriversi al vaccino quando s'accompagna alla linfa una certa quantità di detrito (detritus linfa secondo M. De Biehler); mentre la linfa allo stato di purezza per un prelievo sperimentale e quindi non per applicazione di vaccinazione non sarebbe capace per sè stessa di dare queste reazioni a tipo di esantema. Non viene quindi il dubbio che questi detriti possano creare un potere anafilattogeno. I rapporti fra esantema ed anafilassi furono già presi in considerazione da Kraus a proposito della rivaccinazione obbiettando che in questo caso la comparsa degli esantemi vaccinali era dovuta ad un siero anafilassi verso il siero dei bovini da cui proviene la linfa; questa interpretazione fu negata da altri (Pesci ritenendo che semplice siero bovino non produce tali reazioni se inoculato come il vaccino sulla pelle, e che la linfa umana fresca è quella che dà i fenomeni più intensi). Nel nostro caso la linfa umana dati i due passaggi avvenuti non è più in giuoco e rimane solo il quesito della linfa di provenienza bovina, per risolvere la questione, dato che non si tratta di una prima vaccinazione, si può invece pensare agli elementi eterogenei proteici che s'accompagnano alla linfa (detritus linfa) e dall'altra al fatto che i fenomeni si sono verificati puramente sui lattanti alimentati artificialmente con latte di mucca, mentre quelli alimentati al seno sono rimasti risparmiati. Quindi è razionale supporre, (come avviene che per applicazione percutanee o intracutanee di materiale proteico incriminato si abbiano reazioni locali positive che svelano uno stato di ipersensibilità generale del-

l'organismo di fronte ad un dato antigene), che nel presente caso il materiale vaccinante abbia determinato la comparsa di uno stato di ipersensibilità più che di anafilassi. Tale fenomeno dovrà essere ulteriormente analizzato e controllato nel latte alimentato con latte vaccino verificando il comportamento sia dal punto di vista degli anticorpi del siero rispetto all'antigene, sia dal punto di vista del comportamento dell'individuo verso linfa vaccinica pura, come pure verso il materiale proteico contenuto nel detrito e come controllo verso la cute della mucca. Tali i controlli che mi propongo ulteriormente di proseguire.

Il *Presidente* invita il Dott. G. P. Cucco a svolgere la sua comunicazione:

Ricerche ed osservazioni sul fenomeno della emofagia.

Dott. G. P. Cucco: Il fenomeno dell'emolisi pntiforme che si verifica in alcune particolari circostanze nelle culture di stafilococchi seminati su agar-sangue, prende nome di emofagia. Poichè detto fenomeno si manifesta esclusivamente in presenza di siero di sangue, gli osservatori che si sono occupati di questo argomento hanno emesso l'ipotesi che si tratti di un microrganismo vivente nel siero e che avrebbe la peculiarità di distruggere il pigmento ematico nel caratteristico modo accennato.

L'O. ritiene che la causa del fenomeno debba invece ricercarsi nelle qualità di alcuni speciali ceppi di sfafilococchi. A tale scopo ha istituito ricerche nelle quali pur sostituendo quasi completamente il siero di sangue con sostanze organiche diverse (liquido pleurico, liquido ascitico, albume d'uovo, globuline conservate da tempo) si hanno accenni di produzione di emofagia, naturalmente usando ceppi di stafilococchi spiccatamente emofagici.

Il *Presidente* dà la parola al Dott. I. Davanzo perchè svolga la sua comunicazione:

Accorgimenti tecnici sulla determinazione del potere battericida del sangue in vitro.

Dott. I. Davanzo: È nozione comune che il potere battericida del sangue fra limiti molto ristretti e che la sua azione può essere messa in evidenza solo quando si tratti di quantità molto scarse di germi. Quando invece i germi sono molto numerosi si ha un rapido esauri-

mento delle emolisine, cui segue naturalmente un enorme aumento dei germi, poichè il sangue, finora mezzo di distruzione di essi, ne diventa un pabulum optimum.

Considerando appunto che esiste questa stretta interdipendenza fra grado di potere battericida e numero di germi da impiegarsi e che questo rapporto ha espressione variabile da caso a caso, sarebbe indicato graduare in anticipo la quantità di germi da cimentarsi in ogni esperimento. Ma ciò è molto difficile, a meno che non si voglia fare per ogni prova una lunga serie di quantità variabili dei due elementi del rapporto.

In esperienze mie, fatte all'Istituto di Immunologia e Batteriologia della R. Università di Torino sul potere battericida del sangue, usando sangue di varie persone per lo più di sesso femminile ed impiegando germi diversi, per lo più stafilococchi, ho potuto accorgermi, quanto sia difficile stabilire il giusto rapporto fra quantità di sangue e numero di germi, da impiegarsi per potere ricavare dall'esperimento un indice un po' preciso sul potere battericida del sangue usato. Difatti, usando una quantità di germi troppo scarsa, si può facilmente incorrere in gravi errori nella valutazione giusta del risultato definitivo, attribuendo a differenze minime e casuali carattere definitivo e reale. Quando invece la quantità dei germi è molto grande si può avverare invece un così rapido esaurimento delle emolise, che in brevissimo tempo avviene un così intenso aumento dei germi, da rendere ugualmente impossibile la lettura dell'esperimento.

Usando nelle mie ricerche un numero di germi tale da ottenere sulla prima piastra poche centinaia di colonie ed impiegando per la sospensione 0,5 cc. di sangue defibrinato, avevo potuto inoltre constatare che l'aumento dei germi avviene per lo più improvvisamente a mò direi quasi di esplosione ed in tempo variabile, ma quasi sempre superiore alle cinque ore. Questo aumento dei germi, era accompagnato in tutti i miei esperimenti dal fatto che le piastre si presentavano allora come fossero completamente sterili ed anche un occhio esperto non riusciva a riconoscere delle colonie. Queste piastre si presentavano uniformi di superficie e di trasparenza, conservavano dappertutto il colore caratteristico, dovuto all'aggiunta del sangue, nonostante si fossero impiegati in molti casi degli stafilococchi emolitici. Insomma avevano l'aspetto di piastre sterili ed anche col contacolonie non si scoprivano delle colonie (ingrandimento da 20 a 30 diametri). Per controllare il fenomeno, ho fatto il controllo mi-

croscopico e batteriologico di tutte queste piastre apparentemente sterili ed ottenni sempre risultati positivi, cioè al microscopio si riconoscevano innumerevoli germi e nel trapianto si sviluppavano altrettante colonie. Per meglio conoscere il fenomeno, ho fatto il seguente esperimento. Allestite due serie di sospensione di germi, di cui una concentrata, l'altra diluita, le lasciavo per 48 ore in termostato ed eseguivo poi delle diluizioni a titolo progressivo (1,1 : 50, 1 :500, 1 :5000) e nella quantità di 5 cmc.

Di questi cinque cmc. prelevavo 0,3 e versavo una piastra. In tutte e due le serie le prime piastre, cioè quelle più concentrate, apparivano sterili, nella terza si intravedeva un accenno di sviluppo di piccolissime colonie, mentre nell'ultima, che era la più diluita, si notavano infinite colonie tutte piccolissime a contorni sfumati e senza alone emolitico pure trattandosi in questo caso di stafilococchi emolitici.

Ottenni così la dimostrazione che quando il numero di germi presenti in una piastra oltrepassa un certo grado, cessa da parte di essi, probabilmente per mancanza di spazio, la capacità di formare colonie macroscopicamente visibili e le piastre acquistano l'aspetto di piastre perfettamente sterili. Questo fenomeno si verifica appunto nelle prove sul potere battericida del sangue quando, dopo l'esaurimento delle emolisine, avviene un così enorme e improvviso aumento dei germi, da impedire lo sviluppo di colonie macroscopicamente visibili.

Ho creduto opportuno riferire queste nozioni a titolo di accorgimento tecnico nelle ricerche sulla battericidia, inquantochè nelle prove di questa natura si rende indispensabile il controllo batteriologico e per lo meno microscopico prima di volere dichiarare sterile una piastra.

Il *Presidente* prega il Dott. A. Foà di fare la sua comunicazione:

Sulla influenza in vitro della tubercolina sul fenomeno della sedimentazione delle emazie in rapporto alle varie forme tubercolari.

Dott. A. Foà: Al fine di rendere più sensibile la reazione della velocità di sedimentazione dei globuli rossi applicata per la diagnosi e sopratutto per la prognosi della tubercolare polmonare, Grafe ha consigliato di inoculare piccole dosi di tubercolina (0,03-0,1 mmg.),

tali cioè da non determinare alcun movimento termico perturbatore: l'attività di focolaio si rivelerebbe con una spiccata modificazione della velocità di sedimentazione, pur rimanendo muti gli altri dati clinici.

L'esperimento di Grafe è stato in seguito provato da vari Autori, i quali conclusero variamente. Riferendomi a queste ricerche, mi son proposto di studiare l'azione che la tubercolina può esercitare in vitro, sulla velocità di sedimentazione dei globuli rossi, in soggetti affetti da tubercolosi polmonare.

A questo scopo eseguivo la determinazione della velocità, di sedimentazione col metodo di Linzenmeier, stabilendo in minuti il tempo occorrente alla precipitazione dei globuli rossi nella sospensione: contemporaneamente in altri tubetti eseguivo la stessa reazione aggiungendo alle sospensioni, cm.^{3} 0,1 di tubercolina vecchia di Koch, diluita a 1: 1000, dose che in ricerche preliminari mi aveva dato la maggior costanza nei risultati.

Tali ricerche sono state eseguite su 30 malati di tubercolosi polmonare di varia forma e a diverso stadio: in tutti questi soggetti venne prima praticata la tubercolinoreazione secondo v. Pirquet.

Uguali ricerche ho eseguito su sei individui sani presi come confronto.

Dall'insieme delle osservazioni risulta che in genere nei sani non vi è variazione nella velocità di sedimentazione dei globuli rossi, in seguito ad aggiunta di tubercolina alla sospensione: mentre tale aggiunta in individui malati importa quasi sempre un aumento talora notevole della velocità di sedimentazione (es. caso 8 da 230' a 138', c. 24 da 245' a 105' ecc.). Non si nota un rapporto evidente di tale modificazione, con il risultato della tubercolinoreazione.

È difficile dare una spiegazione esauriente del fenomeno: si potrebbe tuttavia pensare che esistano realmente nel sangue dei tubercolotici degli anticorpi, coi quali agirebbe specificamente la tubercolina cagionando delle variazioni nell'equilibrio colloidale della miscela, onde una variazione della velocità di sedimentazione dei globuli rossi, che ne è una diretta conseguenza.

Il *Presidente* prega il Prof. Leone Lattes di comunicare su:

Le più recenti acquisizioni in tema di gruppi sanguigni.

Prof. L. Lattes: Negli ultimi tempi vi è stata una considerevole fioritura di studi riguardanti il valore antropologico dei gruppi sanguigni. Esso può venire considerato sotto 3 principali aspetti che del resto sono ingranati uno nell'altro. In primo luogo si sono studiate le correlazioni tra la distribuzione dei gruppi sanguigni e determinati caratteri prettamente antropologici quali l'indice cefalico, la statura, i caratteri pigmentari dei peli e dell'iride, e inoltre la precocità della mestruazione, la fecondità, ecc. In secondo luogo, orientandosi maggiormente verso direttive cliniche più sintetiche, si è studiato la correlazione con i tipi costituzionali secondo Viola, Kretschmer, o con gli indici di robustezza generale, estendendo la ricerca anche alla agilità ed alla resistenza sportiva.

In terzo luogo entrando decisamente nell'ambito clinico-costituzionalistico si è studiata la correlazione con la disposizione a contrarre determinate malattie o a imprimere ad esse un particolare andamento.

Quali i risultati di questo considerevole lavoro?

Senza dubbio appare che il gruppo sanguigno è un carattere squisitamente costituzionale, il quale presenta evidenti correlazioni con altri importanti caratteri pure costituzionali. Giova peraltro affermare che in linea generale codesta correlazione è puramente statistica; vale a dire non ha carattere individualistico apprezzabile, sibbene esclusivamente seriale. Non solo: ma la correlazione non è per nulla diretta. Per esempio nei paesi germanici la normale prevalenza del gruppo *A* si accentua negli individui dolicocefali, e si attenua invece nei paesi latini; così nei diversi paesi la pigmentazione bruna è legata al predominio rispettivamente del gruppo *O* o del gruppo *A*. Nella sola Russia (ove vi sono molteplici lavori) appare che in certe regioni il gruppo *O* prevale negli individui a costituzione astenica, in altre in quelli iperstenici od atletoidi.

L'interpretazione di questi fatti è delicata. È verosimile che si tratti di una relazione indiretta nel senso che nelle popolazioni miste (si può dire che tutte le popolazioni studiate sono antropologi-

camente miste) la diversità di origine etnica si rifletta complessivamente su parecchi caratteri propri della popolazione originaria; cosicchè i caratteri antropologici e la frequenza dei gruppi sarebbero coeffetti della diversità d'origine raziale delle due popolazioni mescolatesi.

La interpretazione è valevole anche nei riflessi antropologici criminali; in quanto negli individui criminali e degenerati è stata osservata una distinta prevalenza del gruppo *B*. Non può certo dedursene, come alcuno vorrebbe, una maggiore labilità nel sistema nervoso del gruppo *B*, sibbene verosimilmente che il gruppo *B* in Europa (e specie in Germania) contenga una quantità relativamente maggiore di immigrati dall'Oriente, imperfettamente adattati epperciò più proclivi alle reazioni antisociali.

Nel campo più strettamente clinico-statistico l'affermata maggiore sensibilità del gruppo *A* alla tubercolosi non ha basi di osservazione sufficienti. Maggior fondamento pare avere la più spiccata resistenza degli individui *O* alla malaria; il quale rapporto potrebbe dipendere dal fatto, constatato in Russia, essere la malaria più pericolosa per i settentrionali biondi che per i meridionali bruni, e cioè come fu indicato sopra, dalla mescolanza etnica.

Un rapporto analogo, che però assume un valore clinico-individualistico è costituito dal fatto che in Europa (la cosa pare non si sia verificata in Giappone) la reazione di Wassermann scompare più facilmente negli individui del gruppo *O* e più difficilmente in quelli del gruppo *A B;* senza però che ciò significhi una diversa guaribilità dell'infezione luetica.

Il grande valore antropologico-costituzionale dei gruppi sanguigni è stato riaffermato nelle vivaci discussioni che hanno avuto luogo circa la modalità dell'eredità di essi; poichè si sono contese il campo la dottrina delle due coppie di allelomorfi, liberi o incatenati con o senza possibilità di crossing-over, e quella dei tre allelomorfi multipli. Dai fatti ultimamente messi in evidenza e dalla critica relativa, pare ormai che la dottrina dei tre allelomorfi multipli si sia vittoriosamente affermata con tutte le sue conseguenze teoriche e pratiche.

Infine un altro argomento che si è imposto ultimamente all'attenzione degli studiosi è che le classiche ed ormai assodate proprietà di gruppo *A* e *B* non esauriscono tutte le differenze individuali fra i vari uomini. Landsteiner e Levine hanno mostrato che esistono nelle emazie umane altri antigeni che normalmente non si possono

mettere in evidenza; ma che sono dimostrabili soltanto con esperienze di immunizzazione, principalmente nel coniglio. Questi antigeni che non interferiscono per nulla con quelli gruppo specifici classici, valgono a precisare assai maggiormente la fisionomia individuale di ogni sangue; il che ha una importantissima applicabilità medico-legale. Ma anche nella medicina clinica, poichè tale antigeni latenti possono dar luogo ad immunizzazione anche nell'uomo, si spiegano in tal modo alcuni eventi disgraziati delle trasfusioni ripetute, che con i gruppi sanguigni non erano interpretabili. La nozione che un individuo trasfuso precedentemente, sia pure con donatore del medesimo gruppo, possa comportarsi come un animale in istato di immunizzazione, attiva, ed essere perciò esposto ai rischi di una nuova introduzione d'antigene, deve esser tenuto in massimo conto dal medico trasfusore e rendergli chiara la necessità, prima di ripetere la trasfusione, di procedere nuovamente alla ricerca *diretta* della compatibilità sanguigna.

Sono date per lette le seguenti comunicazioni:

C. Ninni

Immunizzazione locale intradermica della cavia col B. C. G.

La cavia, contrariamente agli animali della specie bovina ed all'uomo, è difficile ad essere vaccinata contro la tubercolosi, a mezzo del B. C. G. per esempio, quando si utilizzano le vie abituali di inoculazione sperimentale.

Ciò dipende da due motivi:

1° Per la sua grande recettività alla tubercolosi sperimentale.

2° Perchè nella cavia l'immunizzazione contro la tubercolosi si stabilisce lentamente e di conseguenza non è ancora molto solida quando si procede un mese dopo all'inoculazione di prova, particolarmente se si usano dosi abbastanza forti di B. di Koch virulenti.

Per stabilire se anche nella cavia fosse possibile ottenere col B. C. G. una solida immunità dopo un mese, ho eseguito, dietro consiglio del prof. Calmette, un primo saggio di immunità locale per via intradermica.

Il 23 ottobre 1929 ho inoculato 10 cavie adulte con due dosi differenti di B. C. G. nel derma della regione laterale dell'addome:

5 cavie hanno ricevuto centigrammi 0,5 di B.C.G.;

5 cavie hanno ricevuto centigrammi 1 di B.C.G.

Due giorni dopo l'inoculazione si osservava un rossore in corrispondenza del tratto inoculato ed una piccola crosta giallastra nel punto di penetrazione dell'ago della siringa.

Dopo 3 giorni si era già formato un piccolo ascesso intradermico, della grandezza di una lenticchia che si è aperto all'esterno nei giorni successivi ed è guarito dopo 5 a 6 giorni, residuando una desquamazione superficiale locale con tendenza all'emorragia per semplice pressione del tratto inoculato. 20 giorni dopo l'inoculazione però tutto era ritornato allo stato normale.

Vi era relazione ganglionare inguinale omolaterale che si mostrava leggermente più accentuata di quella che ordinariamente s'osserva dopo l'inoculazione del B.C.G., per via sottocutanea. Anche la reazione glandolare è scomparsa dopo 8 a 10 giorni.

La prova intradermica alla tubercolina, eseguita con cc. 0,1 di una diluizione all'1/10 di tubercolina bruta dopo 12 giorni dall'inoculazione del B.C.G. sul lato inoculato e sul lato non inoculato di 5 cavie, è stata positiva, con un'accentuazione sensibile sul fianco inoculato.

Il 23 novembre, cioè un mese dopo l'inoculazione di B.C.G. sono state provate le 10 cavie premunite iniettandole nell'istesso tratto di inoculazione e sempre per *via intradermica* con milligrammi 0,000,1 di bacilli tubercolari virulenti dello stipite Bovino Valée.

10 cavie controllo sono state ugualmente inoculate per via intradermica e con l'istessa dose.

Il giorno successivo 7 delle cavie premunite presentavano una reazione allergica nettissima caratterizzata da rossore ed infiltrazione, che disparve dopo 3 a 4 giorni.

Le cavie controllo invece non hanno presentato alcuna reazione locale immediata. Dopo 10 giorni si notava una infiltrazione nodulare della grandezza di un acino di pepe; infiltrazione che in 3 delle suddette cavie era già arrossata. Dopo 15 a 18 giorni anche nelle altre cavie controllo l'infiltrazione nodulare era divenuta rossa e si è ulcerata dando esito a sostanza caseosa. Il nodulo è rimasto ulcerato fino alla morte dell'animale, ricoperto da piccole croste che di tempo

in tempo cadevano, mettendo a nudo la superficie sottostante arrossata, facilmente sanguinante ed in parecchie cavie caseosa.

Sempre nelle cavie controllo la reazione glandolare omolaterale è divenuta sensibile dopo 15 giorni, raggiungendo rapidamente il volume di un cece. Dopo 40 giorni anche le glandole controlaterali dell'inguine erano ingrossate in una buona metà degli animali.

Nelle cavie premunite invece solo dopo 40 giorni si è osservata in 3 una reazione evidente delle glandole regionali; le altre cavie sono rimaste indenni.

Nello spazio di 3 mesi e mezzo sono morte per pasteurellosi 2 cavie premunite, l'una dopo 70 giorni dall'inoculazione di prova, l'altra dopo 85 giorni. Nessuna delle 2 cavie presentava all'autopsia la minima lesione tubercolare, sia degli organi viscerali che del sistema glandolare.

3 altre cavie premunite sono state da me sacrificate contemporaneamente alle cavie controllo morte per tubercolosi. 5 sono viventi ed in ottimo stato generale: fra queste solo una cavia gravida presenta le glandole inguinali ipertrofiche.

Nello stesso spazio di tempo di 3 mesi e mezzo, sono morte 8 cavie controllo; restano viventi 2 cavie controllo che sono tipicamente tubercolose e già presentano il dimagrimento terminale caratteristico.

L'autopsia eseguita sulle cavie controllo, morte nel tempo minimo di 54 giorni, ha sempre rivelato non solamente una tubercolosi glandolare con caseificazione centrale anche delle glandole tracheobronchiali, ma anche la tubercolosi viscerale (milza e fegato); in quelle poi che sono morte dopo l'80° giorno vi era inoltre la tubercolosi polmonare.

Nelle 3 cavie premunite e sacrificate dopo 54, 70 e 90 giorni in ottimo stato generale, non si è riscontrata nè tubercolosi viscerale, nè tubercolosi delle glandole bronchiali e lombari.

Una delle 3 cavie non presentava neanche ipertrofia glandolare regionale; le altre 2 presentavano l'ipertrofia glandolare regionale, ma senza caseificazione: in dette 2 cavie l'ipertrofia era stata già notata durante la vita.

I preparati istologici, eseguiti dal Dr. Couland a cui invio i più vivi ringraziamenti, hanno mostrato che nelle glandole delle 2 cavie insufficientemente premunite vi era solo una periadenite ipertrofica non specifica, mentre il tessuto glandolare era rimasto indenne.

Viceversa le glandole delle cavie controllo presentavano, oltre la caseificazione del tessuto glandolare, le lesioni istologiche tipiche della tubercolosi.

Concludendo, noi possiamo affermare:

1° Le cavie premunite a mezzo del B.C.G. per via intradermica e provate un mese dopo con dosi opportune di B. tubercolari virulenti, presentano in tutti i casi un'immunità locale, che è molto solida nei 2/3 delle suddette cavie.

2° Non sembra vi sia differenza nel grado d'immunizzazione conferito con dosi differenti di B.C.G. cioè di centigrammi 1 e rispettivamente 0.5.

Malca Sadogurskaya-Palevici

La nuova reazione di chiarificazione di Meinicke per la sierodiagnosi della sifilide.

L'interesse che desta a tutto oggi la sierodiagnosi della sifilide è provato da numerosi metodi via via proposti dagli Autori e dalle successive ricerche di controllo riguardo a ciascuno di essi. Resta ormai dimostrato che i nuovi metodi proposti se non superano, certamente non sono inferiori alla classica reazione di Wassermann. Tutti sono concordi che per la sierodiagnosi della sifilide sia quanto mai opportuno di eseguire a lato della reazione di Wassermann le nuove reazioni di floculazione, di precipitazione e simili e tanto più è il numero di reazioni eseguite, tanto meglio. Ma dal punto di vista pratico non sempre si può disporre di quantità di sangue tali, da eseguire a talento qualsiasi reazione, anche prescindendo da esigenze economiche e di tempo. Tra le reazioni che maggiormente, a lato della Wassermann, hanno dato ottimi risultati io cito la reazione di intorbidamento di Meiniche e sovratutto la nuova reazione di chiarificazione pure proposta da Meinicke.

Questa ultima per specificità e sensibilità è per me nettamente superiore alle altre due reazioni ora ricordate. Mi è capitato di osservare in un numero non indifferente di casi che la reazione di Wassermann e quella di intorbidamento di Meinicke risultavano negative, mentre risultava nettamente positiva la reazione di chiarificazione. E in queste circostanze si trattò sempre di casi di soggetti certamente sifilitici più o meno curati da tempo. Ho anche osservato

che la positività della reazione di chiarificazione compare assai precocemente nelle forme iniziali, quando la reazione di Wassermann e quella d'intorbidamento di Meinicke risultano ancora negative. Non ho mai osservato positiva la reazione di chiarificazione in soggetti non sifilitici.

Giulio Vittorio Segre

Sierodiagnosi della gravidanza mediante la modificazione di Sdrodowski alla reazione di Abderhalden.

L'O. ha esperimentato la modificazione alla reazione di Abderhalden proposta da Sdrodowski, modificazione fondata sulla determinazione quantitativa della proprietà proteolitica del siero. Il siero di gestanti ricco di fermenti capaci di scomporre l'albumina della placenta, messo a contatto con tessuto placentare, si arricchirebbe dei prodotti di disintegrazione del tessuto stesso.

La proprietà proteolitica viene saggiata con la ninidrina, eseguendo diluizioni scalari del siero in esame, che è stato a contatto con antigeno placentare per 12-24 ore in termostato, comparativamente con diluizioni dello stesso siero senza antigene, e, come controllo, diluizioni di soluzione fisiologica con antigene. La differenza tra i due titoli darebbe la caratteristica quantitativa dei risultati della reazione.

Su 84 donne gestanti nei primi mesi l'O. ottenne 79 risultati positivi, di cui con differenza di titolo di 250,2 sieri; di 200,5 sieri; di 150,5 sieri; di 100,35 sieri; di 50,32 sieri. In 3 casi la differenza dell'intensità di colorazione non è stata apprezzabile. In 2 casi la reazione fu invertita, cioè la reazione è stata ancora positiva a diluizioni maggiori del siero senza antigene.

In 27 casi l'O. ha impiegato come antigene, invece di tessuto placentare, pezzi di carcinoma uterino, ottenendo in 22 casi la reazione positiva.

In una decina di casi di donne gestanti nei primi mesi eseguì la prova servendosi dell'antigene placenta e di quello carcinoma, ed osservò che la differenza di titolo dei controlli era pressochè uguale.

In 35 donne non gravide la reazione fu positiva in 3, con lievi differenze di titolo (50).

Dal complesso delle indagini eseguite l'O. conclude che la reazione non ha carattere strettamente specifico.

T. De Sanctis Monaldi

Tubercolosi caseosa atipica della cavia da ultravirus tubercolare. Sua importanza pratica.

Noi abbiamo avuto la possibilità di osservare per molti mesi un giovane affetto da tubercolosi fibro-caseosa del lobo superiore del polmone sinistro e il cui espettorato era talora ricco di bacilli di Koch, talora per lunghi periodi del tutto privo.

Impiegando la tecnica di Calmette e Vatis abbiamo voluto vedere se tanto l'espettorato bacillifero, quanto il non bacillifero, contenessero entrambi gli elementi filtrabili tubercolari, o se questi fossero solo condizionati dalla presenza di bacilli di Koch, anche se scarsi, nel materiale sottoposto alla filtrazione.

D'altra parte abbiamo cercato di ottenere con passaggi successivi d'animale ad animale la rivirulentazione dei bacilli acido-resistenti nati dall'ultravirus.

Dopo esserci convinti con numerosi esami di laboratorio (osservazione microscopica diretta, omogeneizzazione, inoculazione alle cavie, cultura), eseguiti per quindici giorni consecutivi, che l'espettorato era privo di bacilli, si procedette alla sua filtrazione attraverso candela Chamberland L_2 secondo le regole dettatate dal Valtis (— 20 cm. Hg.; 8 m').

Un primo gruppo di cavie ricevette 5 cc. di questo filtrato per via sottocutanea. Dopo un mese i gangli inguinali e tracheo-bronchiali furono prelevati e previa emulsione con sabbia di quarzo, vennero inoculati sotto cute ad animali nuovi. Solamente al quarto passaggio si misero in evidenza due gruppi di bacilli acido-resistenti. Identico reperto, un poco più abbondante, si ebbe al quinto passaggio. Negativi furono il sesto e il settimo. La scomparsa delle forme acido-resistenti in questi due ultimi passaggi noi l'attribuiamo al fatto che tra la quinta e la sesta inoculazione erano trascorsi 69 giorni, mentre tra le precedenti v'era stato solo l'intervallo regolare di 30 giorni. Gli autori sono infatti oggi concordi nell'ammettere che durante i primi passaggi d'animale ad animale, la presenza dei bacilli acido-resistenti nel sistema linfatico delle cavie è temporaneo, bacilli che quasi sempre dopo il trentesimo giorno sono scomparsi.

Tutti gli animali inoculati ai primi tre passaggi di questa serie sono stati sacrificati dopo dodici mesi e mezzo, dodici mesi e undici

mesi e mezzo; in nessuno si sono osservate lesioni o presenza di bacilli.

Gli animali dei passaggi successivi sono ancora viventi ed in ottime condizioni.

Un secondo gruppo di due cavie è stato, contemporaneamente al primo, inoculato con 1 cc. di espettorato totale non filtrato. Una cavia fu sacrificata dopo un mese e un gruppo di bacilli tipici fu potuto osservare negli strisci delle ghiandole bronchiali; l'altra uccisa dopo 378 giorni si è mostrata indenne da ogni lesione e l'esame minuzioso dei preparati eseguiti con differenti ghiandole è stato negativo.

Dopo una riacutizzazione delle lesioni polmonari, l'espettorato del nostro ammalato divenne ricchissimo di bacilli di Koch. Si procedette allora alla sua filtrazione secondo la tecnica suaccennata e una terza serie di cavie ricevette sotto cute cc. 5 di questo secondo filtrato.

Al sesto passaggio, soltanto le cavie hanno presentato un'ipertrofia dei gangli inguinali alcuni dei quali hanno raggiunto il volume di un pisello.

Una cavia fu allora sacrificata e all'autopsia mostrò che tutti i gangli linfatici erano ipertrofici, di colorito grigio sporco e aumentati di consistenza. Soltanto il ganglio lombare destro presentava una piccola zona di rammollimento: le preparazioni microscopiche eseguite con il pus ivi prelevato fecero vedere tre gruppi ben netti di bacilli acido-resistenti; quelle eseguite con le altre ghiandole furono tutte negative.

Il volume delle ghiandole delle altre cavie del terzo gruppo cominciò a ridursi verso il quarantacinquesimo giorno dopo l'inoculazione e all'ottantesimo era ritornato normale. Alla palpazione i gangli si sentivano però duri e sfuggivano da sotto le dita come pallini di piombo.

Il quarantaduesimo giorno, le ghiandole inguinali delle cavie del settimo passaggio avevano raggiunto le dimensioni di una nocciola.

Un animale sacrificato, il cinquantesimo giorno mostrò ipertrofia marcata di tutte le ghiandole: alcune delle inguinali erano caseose, le lombari presentavano delle piccole zone di caseificazione disseminate su un fondo grigio pallido sporco, le tracheo-bronchiali avevano una suppurazione centrale con pus abbastanza fluido e biancastro.

L'esame batterioscopico sia della sostanza caseosa che del pus, mostrava numerosi ammassi rotondi e regolari di bacilli, ammassi del tutto simili a piccole colonie costituite da germi acido e non acido-resistenti riuniti in alcuni punti dalla sostanza cianofila di Bezançon.

Gli animali di controllo sono tutti ancor oggi in ottime condizioni e il volume delle ghiandole si va riducendo notevolmente. Prima di sacrificarle attenderemo che sia trascorso un anno dall'inoculazione in modo da esser sicuri che le lesioni osservate non siano in dipendenza di infezioni pauci-bacillari le quali, se possono evolvere, come accennano alcuni autori, molto lentamente, arrivano pur sempre ad una tubercolosi generalizzata classica.

Un quarto e quinto gruppo di cavie vennero inoculati per via sotto cutanea, con cc. 1 di espettorato bacillifero l'uno, e l'altro con 1/1000 di milligrammo di bacilli di Koch dello stipite isolato dall'espettorato stesso.

Gli animali del quarto gruppo morirono dopo 70-75 giorni, quelli del quinto gruppo dopo 80-85 giorni, e tutti con una tubercolosi sperimentale classica tipo Villemin.

Infine abbiamo voluto osservare se partendo dal filtrato dello stipite di bacillo tubercolare isolato dall'escreato bacillifero, si poteva anche ottenere una tubercolosi atipica della cavia tipo Calmette-Valtis.

In questa ultima serie di esperienze abbiamo impiegato il metodo del Ninni che mette in evidenza più facilmente i bacilli nati dall'ultravirus. Abbiamo cioè inoculato direttamente nei gangli laterali del collo della cavia cc. 0,5 di filtrato e nei passaggi cc. 0,5 di emulsione ganglionare. I gangli così inoculati erano prelevati, per l'esame, dopo 8-10 giorni. Nei tre passaggi sinora eseguiti abbiamo sempre messo in evidenza piccoli ammassi di elementi bacillari acido-resistenti, sopratutto abbondanti in un piccolo ascessolino di una ghiandola di terzo passaggio.

In questi animali le ghiandole iniettate si presentavano generalmente ipertrofiche e di consistenza aumentata.

Partendo da espettorati bacilliferi e non bacilliferi abbiamo sempre messo in evidenza le forme di tubercolosi atipica delle cavie tipo Calmette-Valtis. L'espettorato di tubercolosi polmonare anche se abacillifero contiene quindi delle forme filtranti patogene, che dal tipo di lesioni che sou capaci, alla lunga, di riprodurre indicano con certezza la loro natura tubercolare. Noi abbiamo l'impressione che se

gli espettorati non bacilliferi di ammalati di tubercolosi polmonare fossero inoculati in serie, secondo questa nuova tecnica, si otterrebbero sempre delle forme atipiche di tubercolosi. La nostra esperienza di tubercolosi caseosa ganglionare sistematica, costituisce una forma di passaggio tra quelle con soli bacilli acido-resistenti nelle ghiandole senza lesioni anatomiche, e quelle nelle quali si ha la tubercolosi sperimentale classica.

Associandoci alle conclusioni di Paisseau, Valtis, Sergent, Léon Bernard, Oumansky noi crediamo che *oggi per ogni prodotto sospetto tubercolare non ci si deve limitare agli esami ed alle ricerche abituali di laboratorio, ma seguendo la nuova tecnica di Calmette-Valtis ricercare nei gangli linfatici delle cavie, anche dopo 4-5-6 passaggi, i bacilli acido-resistenti.*

Per facilitare questa ricerca e risparmiare del tempo che può essere prezioso, noi preconizziamo, data la sua semplicità, la modificazione apportata dal Ninni al metodo delle inoculazioni.

De Filippis V.

L'azione dello ozono sugli essudati tubercolari e nella infezione sperimentale da bacilli di Koch (Tipo umano).

Mi è sembrato interessante studiare l'eventuale influenza dell'aria ozonizzata sulla vitalità e sulla virulenza del bacillo di Koch negli essudati tubercolari; le trasformazioni indotte da tale gas sui detti liquidi, per quel che si riferisce al loro contenuto in sostanze tossiche di origine tubercolare ed infine le eventuali variazioni nella produzione degli immuncorpi durante il decorso della infezione tubercolare ottenuta con gli stessi liquidi.

Tale studio tende a chiarire quanto si è venuto affermando e comprovando con statistiche da alcuni Tisiologi, che hanno ricavato notevoli vantaggi dalla pratica del pneumotorace con aria ozonizzata (miglioramento delle condizioni generali, diminuzione di numero delle pleuriti parapneumotoraciche).

Le esperienze furono condotte su cavie: alcuni lotti di animali vennero infettati per varie vie (endovenosa, endoperitoneale) rispettivamente con vari liquidi di pleurite parapneumotoracica; altri lotti di cavia vennero infettati corrispondentemente per la stessa via dei

controlli e con gli stessi liquidi, dopo ozonizzazione. Quest'ultima veniva ottenuta facendo gorgogliare nei liquidi stessi (per mezz'ora o tre quarti d'ora) dell'aria uscente dall'intercapedine di un piccolo tubo ozonizzatore, azionato da una corrente di 4 Volta.

Tutte le cavie trattate ammalarono di tubercolosi; quelle infettate con liquidi non ozonizzati progressivamente diventarono cachettiche, poi dispnoiche e morirono in un periodo di tempo variante dagli 8 ai 21 giorni di malattia, presentando alla necroscopia ed all'esame istologico dei visceri il solito quadro della tubercolosi generalizzata.

Viceversa, le cavie trattate con liquidi ozonizzati ammalarono di una infezione a decorso assai lento, decorso che presentò inoltre alcune particolarità che mi riservo di illustrare più diffusamente in seguito. Alcune di dette cavie, dopo un periodo di sopravvivenza variante dagli 80 agli 85 giorni, morirono in seguito ad iniezioni di forti dosi di tubercolina. Altre poche sopravvissero anche a questo trattamento e sono ancora in ottime condizioni, dopo più di 90 giorni di malattia. Alla necroscopia, in tutte tali cavie si mise in evidenza una tubercolosi diffusa, più imponente che nei controlli stessi. Infatti sulla faccia viscerale del loro peritoneo si potevano contare da 40 a 60 grosse masse giallastre formate dal confluire di numerosissimi tubercoli. Altri innumerevoli tubercoli più piccoli erano diffusi sul peritoneo e nei visceri.

Il quadro istopatologico della tubercolosi in queste ultime cavie fu anch'esso assai diverso dal comune. Si notò nei loro visceri una reazione infiammatoria più intensa che nei controlli e nel fegato era assai facilmente dimostrabile una notevole iperplasia ed ipertrofia del S.R.I. Infine i tubercoli in queste cavie si dimostrarono molto ricchi in cellule giganti ed inoltre in numerose formazioni cellulari allungate, atipiche e provviste di molti nuclei.

In tutte le cavie, nelle quali la tubercolosi aveva tale aspetto istologico, fu possibile in vita rilevare un indice opsonico superiore a quello dei controlli ed il siero di tali animali si mostrò dotato di un forte potere che io ritengo antiaggressinico, per cui i bacilli di Koch (negli strisci fatti per determinare l'indice opsonico) apparivano raccolti in masse e cumuli nei pressi dei leucociti.

Infine è stato possibile dimostrare nelle cavie infettate con liquidi ozonizzati una reazione peritoneale eosinofila in tutto paragonabile a quella che è stata osservata nei casi fortunati di pneumotorace terapeutico, praticato con qualsiasi gas.

La resistenza degli animali alla infezione tubercolare ed alla tubercolina (nonostante l'entità delle lesioni) e la presenza di anticorpi in quantità superiore alla norma, comprova, a parer mio, che l'infezione da liquidi ozonizzati decorre con maggior produzione di anticorpi, probabilmente dovuta a quelle stesse sostanze che provocano la già accennata reazione peritoneale eosinofila. Tali sostanze sono in parte già presenti in vitro nei liquidi ozonizzati, e debbono ritenersi di natura tubercolinica in senso lato.

Si può concludere che l'ozono, messo a contatto di sostanze organiche contenenti bacilli di Koch, ne attenua la virulenza e provoca in esse la formazione di sostanze tossiche eosinofilotattiche, a potere immunizzante specifico.

Tale gas, introdotto col pneumotorace, può manifestare dunque delle vere e proprie attività vaccinanti.

Emilio Favero

Note sul valore pratico della reazione di Goldenberg nella tubercolosi.

Col diffondersi nella clinica corrente della reazione di deviazione del complemento per la tubercolosi furono proposti procedimenti varî intesi a renderne più semplice ed agevole l'applicazione e l'impiego.

Goldenberg a tale riguardo ha preconizzato una tecnica che indubbiamente presenta la massima semplicità in quantochè usufruendo delle emolisine naturali contenute nei sieri umani e del complemento del siero stesso non inattivato, permette di eliminare sia l'allestimento del sistema emolitico che la raccolta del siero di animali per la funzione complementare.

Schulte-Tigges afferma che in un numero grandissimo di reazioni eseguite — circa 700 — ha ottenuto dei risultati soddisfacenti col metodo di Goldenberg confrontato col metodo originale di Besredka, ed asserisce di avere avuto dati pressochè sovvrapponibili nei riguardi della specificità.

Le presenti mie ricerche hanno lo scopo di controllare dal lato tecnico il valore della reazione di Goldenberg nel senso della sua attuazione ed applicazione pratica.

Elementi per la reazione. — Per la reazione occorrono:

a) Siero di sangue umano in esame prelevato da non oltre 24 ore e conservato in ghiacciaia ed allo scuro per mantenere quanto più attivo è possibile il complemento. È impiegato attivo.

b) Antigene: antigene di Besredka o antigene metilico di Bouque-Négre (quest'ultimo per l'uso si allestisce riscaldando la fiala di antigene a 45° per circa 2-3′ per sciogliere il precipitato, versandone la quantità conveniente in una provetta graduata ed addizionando a goccie soluzione fisiologica nella proporzione di 19 cc. per un cc. di antigene).

c) Corpuscoli rossi di montone lavati al 5 %.

Tecnica della reazione. — Venne seguìto lo schema del Goldenberg impiegando però una quantità maggiore di siero di sangue (0,3 cc.) poichè in prove preliminari mi è risultata insufficiente la quantità indicata dall'Autore di 0,1 cc. Come antigene inoltre ho impiegato contemporaneamente ambedute gli antigeni sopraccennati.

La tecnica è la seguente:

Si versano in 13 provette numerate progressivamente 0,3 cc. di siero in esame non inattivato. Nelle provette I^a, II^a, III^a si addizionano rispettivamente 0,1, 0,2, 0,3 cc. di antigene Besredka puro e nelle 1^a, II^a III^a rispettivamente 0,2 0,3, 0,4 cc. di antigene metilico diluito all'1: 20. Nelle provette V^a, VI^a, VII^a, VIII^a, IX^a, X^a si versano rispettivamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 cc. di sospensione di corpuscoli rossi al 5 %. La provetta IV^a non contiene che siero umano. In ogni provetta in seguito si versa soluzione fisiologica sino ad ottenere il quantitativo fisso di 0,9 cc. Si hanno così quattro serie di tubi: nella prima serie (I^a-II^a) è contenuto antigene di Besredka + siero; nella seconda serie (I^a-III^a) antigene metilico (diluito) + siero; la terza (IV^a) contiene solo siero e serve di controllo per il tempo di emolisi; la quarta serie (V^a-X^a) serve a determinare il titolo emolitico del siero.

Previa agitazione si portano le provette in termostato a 37° per mezz'ora. Trascorso tale periodo di tempo si procede alla lettura del titolo emolitico, indi dopo aver lasciato i tubi I^a-IV^a e I^a-III^a ancora in termostato a 37° per un'altra mezz'ora si versa in ciascuno di essi la dose di sospensione di corpuscoli rossi completamente emolizzati meno 0,1 cc.

Si mettono nuovamente i tubi in termostato controllando ogni 15′ fino a quando si osserva nel tubo IV^a emolisi completa, e a tal momento si procede alla lettura definitiva.

La tecnica può essere schematizzata come segue:

Primo tempo.

Tubi	Siero	Antigene Besredka	Antigene Metilico	Soluzione Fisiol.	Corpuscoli rossi	
I	0,3	0,1	—	0,5	—	un'ora di termostato
II	0,3	0,2	—	0,4	—	
III	0,3	0,3	—	0,3	—	
I *a*	0,3	—	0,2	0,4	—	
II *a*	0,3	—	0,3	0,3	—	
III *a*	0,3	—	0,4	0,2	—	
IV	0,3	—	—	0,6	—	
V	0,3	—	—	0,5	0,1	½ ora di termostato e lettura del titolo emolitico.
VI	0,3	—	—	0,4	0,2	
VII	0,3	—	—	0,3	0,3	
VIII	0,3	—	—	0,2	0,4	
IX	0,3	—	—	0,1	0,5	
X	0,3	—	—	—	0,6	

Secondo tempo.

Aggiunta di corpuscoli rossi di montone al 5 % secondo il titolo emolitico ottenuto meno 0,1 cc. in tutti i tubi.

L'inibizione dell'emolisi nei tubi I, II, III e rispettivamente I^a, II^a, III^a indica una reazione fortemente positiva (+ + +); l'emolisi nella provetta I e I^a e l'inibizione in II, III, II^a, III^a indica una reazione positiva (+ +); l'emolisi in I, II e I^a II^a e l'inibizione in III, III^a indica reazione debolmente positiva (+); l'emolisi in I, II, III e I^a, II^a, III^a indica reazione negativa.

Nei miei esperimenti ho praticata la reazione di Goldenberg sopra il siero di sangue di 93 ammalate ricoverate nell'Istituto. Le reazioni in 2 casi (2,1 %) non fu applicabile per assenza completa di emolisine naturali, negli altri 91 invece (97 %) rispose tecnicamente e la quantità di emolisine risultò tale da cagionare in media l'emolisi di 0, 2, 0, 3 cc. di corpuscoli rossi al 5 %.

Le malate per semplicità furono divise in due gruppi.

Il primo gruppo è rappresentato da pazienti con forme sospette, od abortive (stabilizzate) e comprende 15 casi: in esse ho ottenuto 11 reazioni negative, cioè emolisi completa e 4 debolmente positive (+). In questi 15 casi i due antigeni hanno dato pressapoco lo stesso risultato.

Il secondo gruppo comprende 76 casi con forme conclamate di tubercolosi polmonari e con localizzazioni più o meno estese ed a differente carattere clinico. Ho creduto opportuno distinguere a parte i casi trattati con pneumotorace e quelli con frenicotomia.

In 27 casi senza particolare trattamento 16 furono positivi con + + + e + +; 2 con +; 1 dubbio e 8 negativi. Tra questi ultimi negativi vanno comprese diverse forme con scarsissima reazione da parte dell'organismo (forme anergiche).

In 46 casi con pneumotorace in atto; 20 furono positivi con + + + e + +; 9 furono positivi con +; e 11 furono negativi.

In 3 casi con frenicotomia: tutti e tre i sieri furono positivi con + +.

Per quanto riguarda i due antigeni essi si sono comportati così:

Nei casi in cui coll'antigene Besredka vi era positività con + + e +, coll'antigene metilico si aveva quasi sempre positività con + + + e + +; ciò che dimostra sensibilità maggiore nelle reazioni eseguite coll'antigene metilico.

L'insieme dei risultati esposti dimostra che tecnicamente applicando le modificazioni da me apportate (0,3 cc. di siero da esaminare invece di 0,1 cc.; antigene metilico di Bouquet-Négre diluito 1: 20 invece dell'antigene Besredka) la reazione di Goldenberg può essere al pari delle altre similari di qualche aiuto alla clinica con il vantaggio di essere assai più semplice della originaria reazione di deviazione di Besredka.

Il *Presidente* prega il Prof. A. Cantani di svolgere il suo O. del G.:

Sulla necessità di intensificare lo studio della Microbiologia in Italia.

Prof. A. Cantani: Sono lieto di poter parlare di questo argomento in occasione di questo Congresso essendo tale precisamente lo scopo altamente lodevole cui si sono ispirati i fondatori della benemerita nostra Società di Microbiologia, della cui esistenza già si cominciano a constatare risultati fecondi di bene per il progredire

della nostra scienza. Sono sicuro perciò di parlare in ambiente oltremodo favorevole e profitto di questa occasione per esprimere i miei concetti al riguardo.

Debbo però premettere che a ciò mi spinge una mia forse ingiusta impressione che mi auguro non venga condivisa dai cultori di questa scienza dinanzi a cui ho l'onore di parlare. Sembra a me che in contraddizione con l'enorme progresso raggiunto in un cinquantennio appena dalla scienza microbiologica, ad esso non corrisponda l'entusiasmo e l'incoraggiamento della pubblica opinione e specialmente di coloro che di questa scienza per l'esercizio della loro professione hanno stretto bisogno ma perfino di sommi maestri della medicina.

Questa mia impressione è suffragata da una constatazione che è quella che nelle nostre Università questa scienza non viene tenuta nella debita considerazione perchè, pure esistendo in ciascuna di esse degli entusiasti cultori della microbiologia, non viene riconosciuto all'insegnamento della microbiologia quella importanza che le dovrebbe spettare. Ed infatti l'insegnamento della microbiologia, non è obbligatorio per gli studenti; in qualche facoltà l'iscrizione ai corsi è stabilita al 2° o al 3° anno di medicina, la cattedra è data in tutte le facoltà solamente per incarico, in qualche facoltà dove già esiste una cattedra ufficiale si tende a sminuirne l'importanza trasformandone l'insegnamento in semplice incarico. I laboratori annessi a questo insegnamento non sono sufficientemente attrezzati nè dotati di quei mezzi a rendere proficuo sia l'insegnamento sia le ricerche ad esso attinenti.

Superfluo riesce far notare inoltre che pur essendo questa scienza imprescindibile coadiuvatrice di quasi tutte le branche della medicina, comprese a mio parere perfino la fisiologia, la chimica biologica, la materia medica, la medicina legale, senza parlare delle altre branche fondamentali quali le cliniche, le patologie, l'igiene, l'anatomia patologica, precisamente per queste ragioni essa deve essere impartita come insegnamento autonomo di cui debbono giovarsi tutte le branche della medicina che di essa hanno bisogno.

E non tralascierò di far notare che sia per gli enormi progressi e il grandioso sviluppo raggiunto in questi ultimi anni sia per la imperiosa necessità di profonde ricerche più che mai necessarie alla sua necessaria evoluzione, l'individuo che si dedica ad essa deve pur avere, per potere con fecondo ardore contribuire al suo progresso, una posizione stabile ed essere fornito dei mezzi adatti a questo scopo.

Non si deve a questo proposito fare l'obbiezione che non esiste la necessità di sviluppare questo studio perchè effettivamente in tutti o quasi i laboratori delle Università si praticano queste ricerche per cui risulterebbe inutile crearne un insegnamento a parte. Non che questi studi si debbano fare solamente nei laboratori annessi alle cattedre di batteriologia, ma ciò non dice che la microbiologia non debba essere insegnata come una scienza a sè o che si debbano abolire le cattedre di batteriologia o tenerle come semplice incarico.

Noi dobbiamo seguire le direttive del nostro grande Duce e non deve succedere che queste vengano frustrate dagli interessi e dai favoritismi personali.

Una lieta constatazione sento anzi il dovere di fare a questo proposito. Siamo in pieno e fervido periodo fascista, fortunatamente sono tramontate tutte quelle mentalità disfattiste, ipercritiche e scettiche che tutto tendevano a distruggere; solo con l'entusiasmo razionalmente istillato nei nostri animi e col coraggio e col disprezzo del pericolo possiamo compiere queste ricerche microbiologiche per cui molte volte mettiamo perfino a repentaglio le nostre vite. Solo il fascismo può quindi sollevarci e farci vivere in più spirabil aere. Abbiamo una prova di ciò nelle misure già prese dall'incomparabile nostro Duce. Egli ha creato due meravigliose istituzioni che tendono a questo scopo, la Reale Accademia d'Italia e il Consiglio Nazionale delle ricerche. « Solo con la ricerca scientifica si può nella vita odierna dei popoli conservare l'equilibrio », ha detto l'illustre Senatore Marconi in occasione dell'odierna riunione del Consiglio delle Ricerche da lui presieduto.

L'illustre Uomo ha anche egli rilevato il decadimento che vi era nel nostro paese delle ricerche scientifiche e la grande penuria dei ricercatori.

Ora, mi permetto io di osservare, anche alla scienza microbiologica spetta il maggiore impulso per l'incremento di queste importanti ricerche che contribuiscono principalmente al bene dell'umanità e al risanamento della stirpe. Per ciò ottenere occorre senza dubbio una sistemazione di questo insegnamento universitario ed una giusta amplificazione dei suoi studi rendendone possibile l'espletamento anche nei centri ospedalieri e specialmente in quelli per le malattie infettive. Per questa ragione mi permetto di presentare a questo onorevole consesso un ordine del giorno che mi auguro venga da tutti accolto.

ORDINE DEL GIORNO.

Il Congresso Nazionale di Microbiologia profondamente convinto della necessità di incrementare lo studio e lo sviluppo di questa scienza per l'insegnamento di essa che per la intensificazione delle ricerche così utili al bene dell'umanità e al rinvigorimento della stirpe, fa voti perchè:

1° Venga stabilizzato nelle diverse Università del Regno questo insegnamento con la trasformazione degli incarici in speciali cattedre autonome.

2° Vengano incrementate le analoghe ricerche fornendo dei mezzi adeguati le rispettive cattedre.

3° Vengano maggiormente incoraggiate dette ricerche anche nei laboratori ospedalieri, specialmente in quelli per le malattie infettive rendendo possibile ai cultori di questa scienza di approfittare del materiale di studio esistente in questi ospedali.

Il *Presidente* mette in discussione l'O. d. G. affermante la necessità che la Microbiologia sia sempre più valorizzata. Segue una discussione sulla dizione dell'O. d. G. infine su proposta del Sen. Lustig, viene approvato il seguente

ORDINE DEL GIORNO:

« L'assemblea fa voti che nelle diverse Facoltà Mediche del Regno venga istituito l'insegnamento regolare di Microbiologia e reso obbligatorio: e là dove sono già istituite cattedre nell'organico dell'Università, non siano soppresse ».

ASSEMBLEA ANNUALE

Esauriti i lavori del Congresso, il Prof. A. Cantani propone che il Congresso del 1931 sia tenuto in Napoli; proposta che raccoglie vivi consensi. Il Sen. A. Lustig, data l'assenza di S. E. De Blasi, propone di lasciare sospesa ogni decisione e di demandare al Presidente la scelta definitiva della sede del III° Congresso Nazionale di Microbiologia. La proposta viene approvata.

I soci presenti si riuniscono quindi in assemblea per l'annuale presentazione del bilancio.

Il Segretario Generale Prof. A. Azzi illustra nei particolari il bilancio del 1929 di cui riportiamo il seguente riassunto:

Attività.

N. 173 quote di Associazione a L. 10	L.	1.730.—
Passività soddisfatta dall'Istituto Sieroterapico Milanese	»	29.752.—
Totale..	L.	31.482.—

Passività.

Spese di traduzione	L.	3.322.—
» » stampa per n. 12 Bollettini	»	26.000.—
» per circolari, stampati diversi, cancell...	»	900.—
» postali	»	1.260.—
Totale spese..	L.	31.482.—

Aperta la discussione sul bilancio, nessun socio chiede la parola, ma con applausi generali l'unanimità dei presenti afferma la propria approvazione.

I Segretari agli atti
Prof. C. Arnaudi – Prof. G. Dessy

Il Presidente
Prof. S. Belfanti

INDICE.

Pag.

Comitato direttivo 5

Inaugurazione del Congresso 7

Intervenuti 8

Discorso inaugurale del Presidente Prof. S. Belfanti 9

Verbali delle Sedute.

Seduta antimeridiana del 22 Marzo

Petri L.: Le variazioni a salti (*saltations*) dei microrganismi e loro significato biologico 13

Curzi M.: Su la mutazione di un ifomicete (*Fusarium moronei*) 49

Morelli E.: Osservazioni sul polimorfismo delle streptotricee 52

Discussione (Zironi – Monti – Morelli) 58–59

Boncinelli U.: Sull'acquisto di caratteri proprii del paratifo *B* da parte del bacillo tifico 59

Bondioli M.: Contributo allo studio del comportamento del cloruro sodico sull'attività dei bacteri lattici predominanti nel latte e nei formaggi 65

Seduta pomeridiana del 22 Marzo.

Favilli G.: Il problema etiologico ed epidemiologico della febbre ondulante 69

Discussione (Bastai – Vercellana – Cantani F. – Cerruti – Stazzi – Zironi – Cantani A. – Micheli – Favilli) 119–135

Cerruti F. C.: Caratteri epidemiologici della febbre ondulatoria in Piemonte 136

Discussione (Rigobello–Cerruti) 142

Cerruti F. C.: Sulla pretesa differenziazione nel genere brucella 143

Pag.

Brotzu G.: Sui rapporti fra bacillo di Bang e *micrococcus melitensis*... 146
Favilli G.: Il metabolismo dello zolfo nei batteri della specie brucella melitensis 153
Casagrandi O.: La maturazione di alcuni *virus* nelle amebe..... 156
Cantani A.: Risultati ottenuti da un nuovo terreno nutritivo per il tifo con l'aggiunta di tripaflavina e da terreni di arricchimento per la emocultura precoce..... 158
Cantani F.: Su di un nuovo antagonista del carbonchio..... 161
Gori P.: Alcune ricerche sul *virus* del vaiolo aviario..... 163
Trivellini A.: Ricerche sui microrganismi-termofili..... 165

Seduta antimeridiana del 23 Marzo

Muggia A.: La eziologia delle malattie esantematiche dell'infanzia.... 169
Canelli A.: Le prove dell'agglutinazione e della deviazione del complemento nella eziologia della scarlattina..... 200
Revelli U.: Ricerche sull'eziologia della scarlattina..... 203
Discussione sulla relazione Muggia e comunicazioni inerenti (Zironi – Stazzi – Segre – Favilli – Carbone – Azzi – Brusa – Guardabassi – Tron – Morelli – Azzi – Brotzu – Azzi – Casagrandi – Revelli Muggia) 206–215
Casagrandi C.: *Micrococcus cinnabareus* 215
Discussione (Carbone – Casagrandi)..... 217–218
Torri G. C.: Sulla permanenza degli anticorpi eterogenei negli animali normali ed anafilatizzati..... 218
Cantani F.: Un quadriennio di esperienze sulla vaccinoterapia locale 221
Cantani A.: Sui risultati dell'associazione della proteinoterapia aspecifica con quella specifica con preparazione di speciali vaccini.. 225
Rigobello G.: Sul comportamento dei sali ed acidi biliari nella lisi del pneumococco 235
Discussione (Foà – Rigobello) 237–238
Rigobello G.: Sull'antagonismo tra il b. piocianeo ed il suo filtrato verso batteri varii in vitro ed in vivo 238
Rigobello G.: Sull'ipersensibilità paradossa negli esantemi vaccinali. 242
Cucco G. P.: Ricerche ed osservazioni sul fenomeno della emofagia.. 244
Davanzo I.: Accorgimenti tecnici sulla determinazione del potere battericida del sangue in vitro..... 244
Foà A.: Sulla influenza in vitro della tubercolina sul fenomeno della sedimentazione delle emazie in rapporto alle varie forme tubercolari 246
Lattes L.: Le più recenti acquisizioni in tema di gruppi sanguigni.... 248

COMUNICAZIONI DATE PER LETTE.

Pag.

NINNI C.: Immunizzazione locale intradermica della cavia col B.C.G... 250

SADOGURSKAYA-PALEVICI M.: La nuova reazione di chiarificazione Meinicke per la sierodiagnosi della sifilide 253

SEGRE V.: Sierodiagnosi della gravidanza mediante la modificazione di Sdrodowski alla reazione di Abderhalden 254

DE SANCTIS MONALDI T.: Tubercolosi caseosa atipica della cavia da *ultravirus* tubercolare. Sua importanza pratica 255

DE FILIPPIS V.: L'azione dell'ozono sugli essudati tubercolari e nella infezione sperimentale da bacilli di Koch (tipo umano)..... 258

FAVERO E.: Note sul valore pratico della reazione di Goldenberg nella tubercolosi 260

CANTANI A.: Sulla necessità di intensificare lo studio della Microbiologia in Italia 263

Ordine del giorno approvato 266

Chiusura del Congresso..... 267

Assemblea della Sezione Italiana della Soc. Int. di Microbiologia.... 267

INDICE DEGLI AUTORI.

Azzi, 209, 213, 214, 267.

Bastai, 120.
Belfanti, 9.
Boncinelli, 59.
Bondioli, 65.
Brotzu, 146, 213.
Brusa, 210.

Canelli, 200.
Cantani A., 129, 158, 225, 263.
Cantani F., 125, 161, 221.
Carbone D., 209, 217.
Casagrandi C., 215.
Casagrandi O., 156, 214, 217.
Cerruti C. F., 126, 136, 142, 143.
Cucco, 244.
Curzi, 49.

Davanzo, 244.
De Filippis, 258.
De Sanctis Monaldi, 255.

Favero, 260.
Favilli, 69, 132, 153, 208.
Foà A., 237, 246.

Guardabassi, 210.
Gori, 163.

Lattes, 248.
Lustig, 266.

Micheli, 130.
Monti, 58.
Morelli, 52, 59, 212.
Muggia, 169, 215.

Ninni, 250.

Petri, 13.

Revelli, 203, 214.
Rigobello, 142, 235, 237, 238, 242.

Sodogurskaya Polevici, 253.
Segre G., 208.
Segre V., 254.
Stazzi, 127, 207.

Torri, 218.
Trivellini, 165.
Tron, 211.

Vercellana, 125.

Zironi, 58, 128, 206.

Prezzo L. 30,—